

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 9 月 13 日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/66134 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/22, 45/00, A61P 5/10, 15/00, 15/08, 15/10, C07K 14/72, 16/28, C12N 15/12, C12Q 1/02, G01N 33/12, 33/50, 33/566, 33/53

305-0044 茨城県つくば市並木3丁目17番地1 ロイヤルコーポヨコタ606号 Ibaraki (JP). 吉田博美 (YOSHIDA, Hiromi) [JP/JP]; 〒300-2741 茨城県結城郡石下町大字国生1444-23 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01716

(22) 国際出願日: 2001 年 3 月 6 日 (06.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-065752 2000 年 3 月 6 日 (06.03.2000) JP  
特願2000-378001 2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000) JP

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本芳男 (MATSUMOTO, Yoshio) [JP/JP]; 〒563-0029 大阪府池田市五月丘5丁目1番3号 武田薬品五月丘寮 Osaka (JP). 渡辺卓也 (WATANABE, Takuya) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka (JP). 日沼州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki (JP). 羽畑祐吾 (HABATA, Yugo) [JP/JP]; 〒

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: RFRP-CONTAINING PROLACTIN SECRETION REGULATORY AGENT

(54) 発明の名称: RFRP含有プロラクチン分泌調節剤

(57) Abstract: A polypeptide having effects of promoting and inhibiting the secretion of prolactin. Owing to these effects, this polypeptide is useful as a prolactin secretion promoter in preventives and remedies for various diseases in which prolactin secretion participates (for example, hypoovarianism, spermatoc underdevelopment, menopause and hypothyroidism), and as a prolactin secretion inhibitor in preventives and remedies for various diseases in which prolactin secretion participates (for example, pituitary tumor, diencephalon tumor, menstrual disorder, autoimmune diseases, prolactinoma, sterility, impotence, amenorrhea, lactorrhea, hyperpituitarism, Chari-Frommel syndrome, Argonz-del Castillo syndrome, Forbes-Albright syndrome, lymphoma, Sheehan's syndrome and spermatogenesis disorder.

[続葉有]

WO 01/66134 A1



---

(57) 要約:

本発明におけるポリペプチドは、プロラクチン分泌の促進および抑制作用を有するため、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精嚢発育不全、更年期障害または甲状腺機能低下などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用であり、プロラクチン分泌抑制剤として、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

## 明 細 書

## RFRP含有プロラクチン分泌調節剤

## 5 技術分野

本発明は新規ポリペプチド（本明細書においては、新規生理活性ポリペプチドと称する場合もある。）またはその部分ペプチドなどを含有するプロラクチン分泌調節剤などに関する。

## 10 背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているグアニンヌクレオチド結合性蛋白質（guanine nucleotide-binding protein、以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行う。

- 15 また、これらのレセプターは、7個の細胞膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプター（7TMR）と総称される。

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターによる生体の機能を調節する経路の一つとして視床下部一下垂体系がある。これは、視床下部ホルモン（向下垂体性ホルモン）によって下垂体からの下垂体ホルモンの分泌が調節され、血中に放出された下垂体ホルモンを介して標的細胞・器官の機能調節が行われるものである。この経路によって、ホメオスタシスの維持や生殖系、  
20 個体の発達、代謝、成長の調節などの生体にとって重要な機能調節が行われている。

- 25 下垂体ホルモンは視床下部ホルモンと標的内分泌腺より分泌される末梢ホルモンによるポジティブフィードバック機構またはネガティブフィードバック機構によって分泌調節されている。

また、これらのホルモン、因子およびそのレセプターは、視床下部一下垂体系だけに限局して存在するのではなく、一般に脳内に広く分布することが知られている。このことから、視床下部ホルモンと呼ばれている物質が、中枢神経系においては神経伝達物質あるいは神経調節物質として機能していると考えられている。

また、末梢組織においても同様に分布し、それぞれ重要な機能を担っていると考えられている。

以上のことから、G蛋白質共役型レセプターとそのリガンドによる生体の機能の調節、とくに視床下部ホルモンの分泌調節により下垂体からの下垂体ホルモンの分泌を調節する薬剤の開発が望まれていた。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、R F amide様、または R S amide様構造を有することを特徴とする生理活性ペプチド、特に配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドまたはその部分ペプチドがプロラクチンの放出を調節する作用を有することを見出し、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤、

(2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列である上記

(1) 記載の剤、

(3) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそ

のアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤、

(4) 配列番号：1の第81番目 (Met) ないし第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(5) 配列番号：1の第101番目 (Ser) ないし第112番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(6) 配列番号：1の第124番目 (Val) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(7) 配列番号：1の第56番目 (Ser) ないし第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有する上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(8) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドのアミドまたはその塩を含有する上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(9) C末端のカルボキシル基がアミド化されている配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの部分ペプチドまたはその塩を含有する上記 (8) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(10) プロラクチン分泌促進剤である上記 (1) または上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(11) プロラクチン分泌抑制剤である上記 (1) または上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

(12) 卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全の予防または治療薬である上記 (10) 記載のプロラク

チン分泌促進剤、

- (13) 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロネル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の予防または治療薬である上記 (11) 記載のプロラクチン分泌抑制剤、
- 5 (14) 畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤である上記 (1) または上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

- 10 (15) プロラクチン分泌機能の検査薬である上記 (1) または上記 (3) 記載のプロラクチン分泌調節剤、

- (16) (i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、
- 15 (i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または
- 20 (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

- (i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポ
- 25

## 5.

- リペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1
- 5 5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴と
- 10 10するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤、
- 15 15(17)(I)(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエ
- 20 20テルまたはその塩、および(iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドも
- 25 25しくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくは

はそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

- (II) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミド
- 5 もしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部
- 10 分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴と
- 15 するポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有
- 20 することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤、

- (18) (1) 配列番号：1の第81番目 (Met) ないし第92番目 (Phe) のア
- 25 ミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(2) 配列番号：1の第101番目 (Ser) ないし第112番目 (Ser) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま



- たはその塩、(3) 配列番号: 1 の第 1 2 4 番目 (Val) ないし第 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(4) 配列番号: 1 の第 5 6 番目 (Ser) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(5) 配列番号: 1 4 の第 8 1 番目 (Met) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(6) 配列番号: 1 4 の第 1 0 1 番目 (Ser) ないし第 1 1 2 番目 (Leu) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(7) 配列番号: 1 4 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(8) 配列番号: 3 3 の第 8 3 番目 (Val) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(9) 配列番号: 3 3 の第 1 1 8 番目 (Phe) ないし第 1 2 5 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(10) 配列番号: 3 3 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (11) 配列番号: 5 0 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (19) 上記 (18) 記載のペプチドのアミドまたはその塩、
- (20) C末端のカルボキシル基がアミド化されている上記 (18) 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、
- (21) 上記 (18) 記載のペプチドをコードするDNA、
- (22) (1) 配列番号: 2 の第 2 4 1 番目ないし第 2 7 6 番目の塩基配列、(2) 配列番号: 2 の第 3 0 1 番目ないし第 3 3 6 番目の塩基配列、(3) 配列番号: 2 の第 3 7 0 番目ないし第 3 9 3 番目の塩基配列、(4) 配列番号: 2 の第 1 6 6 番目ないし第 2 7 6 番目の塩基配列、(5) 配列番号: 1 5 の第 2 4 1 番目な

- いし第276番目の塩基配列、(6)配列番号:15の第301番目ないし第336番目の塩基配列、(7)配列番号:15の第172番目ないし第276番目のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(8)配列番号:34の第247番目ないし第282番目の塩基配列、
- 5 (9)配列番号:34の第352番目ないし第375番目の塩基配列、(10)配列番号:34の第172番目ないし第282番目の塩基配列、または(11)配列番号:51の第172番目ないし第282番目の塩基配列を有する上記(21)記載のDNA、
- (23)上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、
- 10 (24)上記(21)記載のDNAまたは上記(23)記載の抗体を含有してなる診断剤、
- (25)上記(21)記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、
- 15 (26)上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤、
- (27)上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、
- (28)プロラクチン分泌調節剤である上記(27)記載の医薬、
- 20 (29)上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (30)さらに配列番号:37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記(29)記載のスクリーニング方法、
- 25

(31) 上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 5 (32) 上記(29)記載のスクリーニング方法または上記(31)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる上記(18)記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

- 10 (33) プロラクチン分泌調節作用を有する医薬を製造するための(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の使用、

- 15 (34) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル  
20 またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方法、

(35) プロラクチン分泌調節作用を有する医薬を製造するための、

- (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくは  
25 はそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそ

の塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の使用、

(36) プロラクチン分泌調節作用を有する医薬を製造するための、

(I) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の

- アミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、
- (II) (i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま

たはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の使用、

(37) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもし

- くはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1  
で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有す  
ることを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくは  
そのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の
- 5 スクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミ  
ノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴と  
するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、また  
は (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア  
ミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくは
- 10 そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化  
合物またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とするプロラクチン分泌調  
節方法、および
- (38) (I) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的  
に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはその
- 15 アミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表され  
るアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有すること  
を特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエ  
ステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同  
一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、または
- 20 その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用  
いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もし  
くは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドも  
しくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：
- 25 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有  
することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもし  
くはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩  
のスクリーニング方法、または、

- (II) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および(iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方法などを提供するものである。

さらには、本発明は、

- (39) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、  
25 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載の剤、



(40) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、

①配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ

- 5 酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1、配列番号：8、配列番号：14、配列番号：18、配列番号：33または配列番号：50で表されるアミノ酸配列中の1～20個以上（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個以上、より好ましくは、1～3個以上）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記（1）記載の剤、

- （36）配列番号：37で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記（17）記載の剤、

- （37）配列番号：37で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：37で表されるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：37で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：37で表されるアミノ酸配列中の1～20個以上（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個以

上、より好ましくは、1～3個以上)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(17)記載の剤などを提供するものである。

5 図面の簡単な説明

図1は参考例2で得られた本発明のポリペプチド(ヒト型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図2は本発明のポリペプチドの疎水性プロットを示す図を示す。

図3は参考例3で得られた本発明のポリペプチド(ヒト型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図4は参考例4で得られた本発明のポリペプチド(ウシ型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

図5は参考例5で得られた本発明のポリペプチド(ラット型)をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

15 図6は参考例3、4、5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の比較を示す。

図7は参考例6で得られた本発明のポリペプチド(マウス型)のアミノ酸配列および該ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

図8は参考例7で行われたサイトセンサーによるrOT7T022L受容体発現CHO細胞に対するペプチドの反応性を示す図を示す。図中、●-●はMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39)、△-△はVPNLPQRFamide (配列番号: 40)を示す。

図9は参考例10で行われたMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39)、VPNLPQRFamide (配列番号: 40)のrOT7T022L発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す図を示す。図中、□-□はMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39)、●-●はVPNLPQRFamide (配列番号: 40)を示す。

図10は実施例1で行われた血漿中に含まれるプロラクチン量の測定結果を示す。

す。図中、●—●は配列番号：39で表わされるペプチドを溶解させたPBS投与群のプロラクチン量を、○—○はPBSのみを投与した対照群のプロラクチン量を示す。

また、投与した時間を0分とし、\*は危険率： $p < 0.05$ を、\*\*は危険率： $p < 0.01$ を示す。

図11は参考例13で行われた抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体1F3を用いた競合的EIAにおけるRFアミド関連ペプチドの反応性の結果を示す。

抗マウスIgGAM抗体をコートした96穴プレートに、抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体1F3 50 $\mu$ l、横軸に示す濃度のペプチド50 $\mu$ lを加えた。4℃にて16時間インキュベートした後、HRP-rat RFRP-1を加え、さらに室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄後、HRP活性を450nmにおける吸光度として測定した。Bはペプチドを加えたときの吸光度、B<sub>0</sub>はペプチドを加えないときの吸光度を示す。

図中、—●—は配列番号：50で表されるアミノ酸配列の第83番目（Val）～第94番目（Phe）のアミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド（VPHSAANLPLRF-NH<sub>2</sub>）、—▲—は配列番号：50で表されるアミノ酸配列の第90番目（Leu）～第94番目（Phe）のアミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド（LPLRF-NH<sub>2</sub>）、—■—は配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第124番目（Val）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド（VPNLPQRF-NH<sub>2</sub>）、—◆—は配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第128番目（Pro）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド（PQRF-NH<sub>2</sub>）を示す。

図12は実施例2で行われたウシ視床下部からの内因性RFRP-1の最終精製のクロマトパターン図を示す。

最終精製段階の $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10のクロマトグラムを示す。縦軸は215nmの吸光度とアセトニトリルの溶出濃度を示し、横軸は溶出時間を示す。図中の黒いカラムは各フラクションの抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体1F3を

用いた競合的EIA を用いて測定したRFRP-1様免疫活性を示す。

図 1 3 は実施例 4 で得られたプラスミドpTFCRFRP-1の構築図を示す。

図 1 4 は実施例 8 で行われた各種ペプチドのホルスコリン処理による細胞内 cAMP 量の増加抑制活性を示す図を表す。図中、—○—はhRFRP-1-12 (配列番号：

- 5 1 の第 8 1 番目 (Met) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチド)、—■—はhRFRP-1-37 (配列番号：1 の第 5 6 番目 (Ser) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチド)、—◇—はrRFRP-1-37 (配列番号：5 0 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチド、—▲—はhRFRP-2-12 (配列番号：1 の第 1 0 1 番目 (Phe) ないし第 1 1
- 10 2 番目 (Ser) のアミノ酸配列を有するペプチド、—□—はhRFRP-3-8 (配列番号：1 の第 1 2 4 番目 (Val) ないし第 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチド、—◆—はPQRFamide (Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド、—●—はLPLRFamide (Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド、—▲—はNPFF (Asn-Pro-Phe-Pheで表されるペプチド) を示す。

- 15 図 1 5 は実施例 9 で行われたRFRPペプチドによるヒトOT7T022受容体の活性化に及ぼす百日咳毒素の効果を cAMP 産生抑制作用を指標にして表した図を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明の配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
- 20 のアミノ酸配列を有するポリペプチド (以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある) は、ヒトや温血動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) の細胞 (例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、
- 25 筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞

胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など) もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など) に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列として  
15 は、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列として  
20 は、例えば、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列の第22~180番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としてより具体的には、例えば、配列番号8、配列番号: 14、配列番号: 18、配列番号: 33または配列番号: 50で表わされるアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列(例えば、配列番号: 8、配列番号: 14、配列番号: 18、配列番号: 33または配列番号: 50で表わされるアミノ

酸配列など)を有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと同様にプロラクチン分泌調節活性を有するポリペプチドである。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に(例、生理化学的に、または薬理的に)同質であることを示す。従って、プロラクチン分泌調節活性が同等(例、

- 5 約0.1~100倍、好ましくは約0.5~10倍、より好ましくは0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

プロラクチン分泌調節活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述する実施例1に従って測定することができる。

- 10 また、本発明のポリペプチドとしては、例えば、①配列番号:1、配列番号:8、配列番号:14、配列番号:18、配列番号:33または配列番号:50で表わされるアミノ酸配列中の1~20個(好ましくは、1~15個、さらに好ましくは、1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:1、配列番号:8、配列番号:14、配列番号:18、配列番号:33または配列番号:50で表わされるアミノ酸配列に1~20個(好ましくは、1~15個、さらに好ましくは、1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:1、配列番号:8、配列番号:14、配列番号:18、配列番号:33または配列番号:50で表わされるアミノ酸配列に1~20個(好ましくは、1~15個、さらに好ましくは、1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号:1、配列番号:8、配列番号:14、配列番号:18、配列番号:33または配列番号:50で表わされるアミノ酸配列中の1~20個(好ましくは、1~15個、さらに好ましくは、1~5個、より好ましくは、1~3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどのいわゆるムテインも含まれる。
- 15  
20  
25

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：14 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：18 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：33 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド、配列番号：50 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（ $\text{-COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $\text{-COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $\text{-CONH}_2$ ）またはエステル（ $\text{-COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{5-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断され

て生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば－OH、－SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。以下、これらのポリペプチドを本発明のポリペプチドと略称することもある。

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド（図1）、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド（図3）、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するウシ由来のポリペプチド（図4）、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するラット由来のポリペプチド（図5）、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有するマウス由来のポリペプチド（図7）、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有するラット由来のポリペプチドなどが用いられ、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチド、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するウシ由来のポリペプチドが好ましく用いられる。

本発明のポリペプチドの部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称する場合がある）としては、前記した本発明のポリペプチドの部分ペプチドであって、本発明のポリペプチドの受容体（具体的には、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩）を発現する細胞に添加することにより発現するプロラクチン分泌調節活性を有するものであればいかなるものでもよい。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好



ましくは、1～3個のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有していてもよく、それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有していてもよい。

- 5      また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。なかでも、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）であるものが好ましい。

- 10      本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のポリペプチドと同様に、  
15      N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。以下、これらの部分ペプチドを本発明の部分ペプチドと略称することもある。  
20

本発明のポリペプチドの部分ペプチドとして好ましくは、R F amide、R S amideまたはR L amide構造を有するペプチド、より好ましくは、R F amideまたはR S amide構造を有するペプチド、特に好ましくは、R F amideを有するペプチドが挙げられる。

- 25      R F amide構造とは、ペプチドのC末端がArginine（アルギニン）-Phenylalanine（フェニルアラニン）- $\text{NH}_2$ 構造になっていることをいい、R S amide構造とは、ペプチドのC末端がArginine（アルギニン）-Serine（セリン）- $\text{NH}_2$ 構造になってい

ることをいい、RLamide構造とは、ペプチドのC末端がArginine (アルギニン) -Leucine (ロイシン) -NH<sub>2</sub>構造になっていることを意味する。

これら本発明の部分ペプチドの中でも、例えば、

- ① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目  
5 (Phe)、第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92  
番目 (Phe)、第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～  
112番目 (Ser)、第115番目 (Asn) ～第131番目 (Phe)、第124番  
目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番  
目 (Met) ～112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のア  
10 ミノ酸配列を含有するペプチド、
- ② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目  
(Phe)、第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92  
番目 (Phe)、第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～  
112番目 (Ser)、第115番目 (Asn) ～第131番目 (Phe)、第124番  
15 目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番  
目 (Met) ～112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のア  
ミノ酸配列を含有するペプチド、
- ③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) ～第92番  
目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～第  
20 112番目 (Leu)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met)  
～第92番目 (Phe) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配  
列を含有するペプチド、
- ④ 配列番号：33で表わされるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) ～第94番  
目 (Phe)、第83番目 (Val) ～第94番目 (Phe)、第84番目 (Pro) ～第9  
25 4番目 (Phe) または第118番目 (Phe) ～第125番目 (Phe) のアミノ酸配  
列を含有するペプチド、
- ⑤ 配列番号：50で表わされるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) ～第94番

目 (Phe) または第 8 4 番目 (Pro) ~ 第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい例としてあげられ、

特に、

- ① 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 5 6 番目 (Ser) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 7 3 番目 (Met) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Ser) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ~ 1 1 2 番目 (Ser)、第 1 1 5 番目 (Asn) ~ 第 1 3 1 番目 (Phe) または第 1 2 4 番目 (Val) ~ 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、
  - ② 配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列の第 5 6 番目 (Ser) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 7 3 番目 (Met) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Ser) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ~ 1 1 2 番目 (Ser)、第 1 1 5 番目 (Asn) ~ 第 1 3 1 番目 (Phe) または第 1 2 4 番目 (Val) ~ 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、
  - ③ 配列番号：1 4 で表わされるアミノ酸配列の第 5 8 番目 (Ser) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ~ 第 1 1 2 番目 (Leu) または第 1 2 4 番目 (Val) ~ 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、
  - ④ 配列番号：3 3 で表わされるアミノ酸配列の第 5 8 番目 (Ser) ~ 第 9 4 番目 (Phe)、第 8 3 番目 (Val) ~ 第 9 4 番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Pro) ~ 第 9 4 番目 (Phe) または第 1 1 8 番目 (Phe) ~ 第 1 2 5 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、
  - ⑤ 配列番号：5 0 で表わされるアミノ酸配列の第 5 8 番目 (Ser) ~ 第 9 4 番目 (Phe) または第 8 4 番目 (Pro) ~ 第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい例としてあげられる。
- なかでも、
- ① 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 5 6 番目 (Ser) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 7 3 番目 (Met) ~ 第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ~ 第 9 2

番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Ser) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ～  
1 1 2 番目 (Ser)、第 1 1 5 番目 (Asn) ～第 1 3 1 番目 (Phe) または第 1 2  
4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

② 配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列の第 5 6 番目 (Ser) ～第 9 2 番目  
5 (Phe)、第 7 3 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2  
番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Ser) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ～  
1 1 2 番目 (Ser)、第 1 1 5 番目 (Asn) ～第 1 3 1 番目 (Phe) または第 1 2  
4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

③ 配列番号：1 4 で表わされるアミノ酸配列の第 5 8 番目 (Ser) ～第 9 2 番  
10 目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 0 1 番目 (Ser) ～第  
1 1 2 番目 (Leu) または第 1 2 4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸  
配列を含有するペプチド、

④ 配列番号：3 3 で表わされるアミノ酸配列の第 5 8 番目 (Ser) ～第 9 4 番  
目 (Phe)、第 8 3 番目 (Val) ～第 9 4 番目 (Phe) または第 1 1 8 番目 (Phe)  
15 ～第 1 2 5 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

⑤ 配列番号：5 0 で表わされるアミノ酸配列の第 5 8 番目 (Ser) ～第 9 4 番  
目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましく、  
とりわけ、

① 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 5 6 番目 (Ser) ～第 9 2 番目  
20 (Phe)、第 7 3 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2  
番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Ser) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 1 5 番目 (Asn) ～  
第 1 3 1 番目 (Phe) または第 1 2 4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ  
酸配列を含有するペプチド、

② 配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列の第 5 6 番目 (Ser) ～第 9 2 番目  
25 (Phe)、第 7 3 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2  
番目 (Phe)、第 8 4 番目 (Ser) ～第 9 2 番目 (Phe)、第 1 1 5 番目 (Asn) ～  
第 1 3 1 番目 (Phe) または第 1 2 4 番目 (Val) ～1 3 1 番目 (Phe) のアミノ

酸配列を含有するペプチド、

③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) または第124番目 (Val) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。

5 なかでも、

① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) または第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

10 ② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) または第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) または第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましく、

とりわけ、

① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

20 ② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましく、

特に、

25 ① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、

② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目

(Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチド、  
が好ましい。

また、本発明の部分ペプチドの好ましい例として、

- (a) 配列番号：1 の第 8 1 番目 (Met) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配  
5 列を有するペプチド、
- (b) 配列番号：1 の第 1 0 1 番目 (Ser) ないし第 1 1 2 番目 (Ser) のアミノ  
酸配列を有するペプチド、
- (c) 配列番号：1 の第 1 2 4 番目 (Val) ないし第 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ  
酸配列を有するペプチド、
- 10 (d) 配列番号：1 の第 5 6 番目 (Ser) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配  
列を有するペプチド、
- (e) 配列番号：1 4 の第 8 1 番目 (Met) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸  
配列を有するペプチド、
- (f) 配列番号：1 4 の第 1 0 1 番目 (Ser) ないし第 1 1 2 番目 (Leu) のアミ  
15 ノ酸配列を有するペプチド、
- (g) 配列番号：1 4 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸  
配列を有するペプチド、
- (h) 配列番号：3 3 の第 8 3 番目 (Val) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸  
配列を有するペプチド、
- 20 (i) 配列番号：3 3 の第 1 1 8 番目 (Phe) ないし第 1 2 5 番目 (Phe) のアミ  
ノ酸配列を有するペプチド、
- (j) 配列番号：3 3 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸  
配列を有するペプチド、
- (k) 配列番号：5 0 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸  
25 配列を有するペプチドなどがあげられる。

特にこれらのペプチドのアミド体 (好ましくは、これらペプチドの C 末端のカ  
ルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ ) がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド) が好

ましい。

具体的には配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド (配列番号：39)、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～第112番目 (Ser) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド (配列番号：41) および配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド (配列番号：40) などがあげられる。

- なかでも、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド (配列番号：39) または、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド (配列番号：40) などが好ましく、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列で表されるペプチドのC末端がアミド化された ( $-\text{CONH}_2$ ) ペプチド (配列番号：39) が特に好ましい。

- 本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸、有機酸) や塩基 (例、アルカリ金属塩) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

- 本発明のポリペプチドもしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコード

するDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

- ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み  
5 合わせるにより精製単離することができる。

- 本発明のポリペプチドもしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、  
10 ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげる  
15 ことができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、本発明のポリペプチドもしくはその塩または本発明の部分ペ  
20 チドもしくはその塩を取得する。

- 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性  
25 化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加するこ



とができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジル

エステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

5 セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級 ( $C_{1-6}$ アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

10 チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、 $Cl_2$ -Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

15 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたもの  
20 としては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、  
25 ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-2

0℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 10 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

25 本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドもしくは部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る  
5 部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide  
10 Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、  
15 (1977年)
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体で  
20 ある場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであっても  
25 よい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する)

5 によって増幅することもできる。

本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51  
10 1 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性（例、細胞刺激活性など）を有するポリペプチドをコードする DNA などであれば何れのものでよい。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34 または配列番号：51 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる DNA としては、例えば、それぞれ配列番号：2 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな  
25 条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19~40 mM、好ましくは約 19~20 mM で、温度が約 50~70℃、好ましくは約 60

～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：50で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有する

DNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

- 5     ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

- 配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：34または配列番号：51で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAでコードされるポリペプチドは後述の本発明のポリペプチドの製造法と同様に  
10     して製造することができ、該ポリペプチドのアミド、エステル、塩は上述の本発明のポリペプチドのアミド、エステル、塩と同様のものなどがあげられる。

また、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしてより具体的には、

- ① 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92  
15     番目 (Phe)、第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～112番目 (Ser)、第115番目 (Asn) ～第131番目 (Phe)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイスト  
20     リンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、

- ② 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第81番目 (Met) ～第92  
25     番目 (Phe)、第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ～112番目 (Ser)、第115番目 (Asn) ～第131番目 (Phe)、第124番目 (Val) ～131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ～112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイスト

ンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、

- ③ 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列の第58番目（Ser）～第92番目（Phe）、第81番目（Met）～第92番目（Phe）、第101番目（Ser）～第112番目（Leu）、第124番目（Val）～第131番目（Phe）、第1番目（Met）  
5 ～第92番目（Phe）または第1番目（Met）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、

- ④ 配列番号：33で表わされるアミノ酸配列の第58番目（Ser）～第94番目（Phe）、第83番目（Val）～第94番目（Phe）、第84番目（Pro）～第94番目（Phe）または第118番目（Phe）～第125番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、

- ⑤ 配列番号：50で表わされるアミノ酸配列の第58番目（Ser）～第94番目（Phe）または第84番目（Pro）～第94番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有するDNA、などがあげられる。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目（Met）～第92番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：42で表される塩基配列（配列番号：2で表される塩基配列の第241番目ないし第276番目の塩基配列）を含有するDNA、

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第101番目（Ser）～第112番目（Ser）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：43で表される塩基配列（配列番号：2で表される塩基配列の第301番目ないし第336番目の塩基配列）を含有するDNA、

25 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第124番目（Val）～第131番目（Phe）のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：44で表される塩基配列（配列番号：2で表される塩基配列の第370番



目ないし第393番目の塩基配列)を含有するDNA、

配列番号:1で表わされるアミノ酸配列の第1番目(Met)～第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号:45で表される塩基配列(配列番号:2で表される塩基配列の第1番目ないし第276番目の塩基配列)を含有するDNA、

配列番号:1で表わされるアミノ酸配列の第1番目(Met)～112番目(Ser)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号:46で表される塩基配列(配列番号:2で表される塩基配列の第1番目ないし第336番目の塩基配列)を含有するDNA、および配列番号:1で表わされるアミノ酸配列の第1番目(Met)～131番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号:47で表される塩基配列(配列番号:2で表される塩基配列の第1番目ないし第393番目の塩基配列)を含有するDNAなどがあげられる。

また、配列番号:1で表されるアミノ酸配列の第56番目(Ser)～第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号:2で表される塩基配列の第166番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号:1で表されるアミノ酸配列の第73番目(Met)～第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号:2で表される塩基配列の第217番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号:1で表されるアミノ酸配列の第84番目(Ser)～第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号:2で表される塩基配列の第253番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号:1で表されるアミノ酸配列の第115番目(Asn)～第131番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列

番号：2で表される塩基配列の第346番目～第393番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9  
5 で表される塩基配列の第169番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第73番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9  
10 で表される塩基配列の第220番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9  
で表される塩基配列の第244番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

15 配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第84番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9  
で表される塩基配列の第253番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～第112番目  
20 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表される塩基配列の第304番目～第336番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第115番目 (Asn) ～第131番目  
(Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列  
25 番号：9で表される塩基配列の第346番目～第393番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～第131番目

(Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表される塩基配列の第373番目～第393番目の塩基配列を含有するDNA、

5 配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第1番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表される塩基配列の第1番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第1番目 (Met) ～第112番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表される塩基配列の第1番目～第336番目の塩基配列を含有するDNA、

10 配列番号：8で表されるアミノ酸配列の第1番目 (Met) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表される塩基配列の第1番目～第393番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15  
15 5で表される塩基配列の第172番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15  
20 5で表される塩基配列の第241番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第101番目 (Ser) ～第112番目 (Leu) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列の第301番目～第336番目の塩基配列を含有するDNA、

25 配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第124番目 (Val) ～第131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列の第370番目～第393番目の塩基配列を含有するDNA、

有するDNA、

配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第1番目(Met)～第92番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列の第1番目～第276番目の塩基配列を含有するDNA、

- 5 配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第1番目(Met)～第131番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：15で表される塩基配列の第1番目～第393番目の塩基配列を含有するDNA、

- 配列番号：33で表されるアミノ酸配列の第58番目(Ser)～第94番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表される塩基配列の第172番目～第282番目の塩基配列を含有するDNA、
- 10

- 配列番号：33で表されるアミノ酸配列の第83番目(Val)～第94番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表される塩基配列の第247番目～第282番目の塩基配列を含有するDNA、
- 15

- 配列番号：33で表されるアミノ酸配列の第84番目(Pro)～第94番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表される塩基配列の第250番目～第282番目の塩基配列を含有するDNA、

- 20 配列番号：33で表されるアミノ酸配列の第118番目(Phe)～第125番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：34で表される塩基配列の第352番目～第375番目の塩基配列を含有するDNA、

- 配列番号：50で表されるアミノ酸配列の第58番目(Ser)～第94番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表される塩基配列の第172番目～第282番目の塩基配列を含有するDNA、
- 25

配列番号：50で表されるアミノ酸配列の第84番目(Pro)～第94番目(Phe)のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：51で表される塩基配列の第250番目～第282番目の塩基配列を含有するDNAなどがあげられる。

- 5 本発明のポリペプチドもしくはその部分ペプチド、後述の本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドおよびこれらの蛋白質またはペプチドをコードするDNAは、自体公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげ  
10 られる。

- 本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド（以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有  
15 する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2  
20 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

- DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km (宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped  
25 duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、ま

たは所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNA

5 アダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

10 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、  
λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、  
バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pR  
15 c/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあ  
20 げられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である  
25 場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞であ

る場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 60巻, 160(1968)], JM103〔ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA22

1. [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

- 5     パチルス属菌としては、例えば、パチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞



などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・  
ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene),  
5 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・  
ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1  
979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods  
10 in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・  
オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエ  
スエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)など  
に記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー  
15 (Bio/Technology, 6, 47-55(1988)) などに記載の方法に従って行なうことがで  
きる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロ  
トコル. 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology),  
52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

20 このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで  
形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養  
に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生  
育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、  
25 例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、  
例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カ  
ゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機

物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

10 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が  
15 20 あげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962))  
25 に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science) , 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology) , 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メ  
5    メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～4  
10    0℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

15    本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン  
20    X-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせで行なうことができる。こ  
25    れらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲ

- 5      ル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

        かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 10      なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。
- 15      かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在または活性は、標識したりガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の
- 20      受容体（以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある）として具体的には、例えば、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などがあげられる。

- 本発明のレセプター蛋白質は、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例
- 25      えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチ

ユラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位

- 5 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

- 15 配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 20 本発明の配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 37で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましく、具体的には、配列番号: 54で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などがあげられる。

- 25 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

- また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。
- 15 本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。
- 20 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{5-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。
- 25

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- 5      さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、
- 10    分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

- 本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：37で表わ
- 15    されるアミノ酸配列を含有するラット由来のレセプター蛋白質、配列番号：54で表されるヒト由来のレセプター蛋白質などが用いられる。

- 本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、
- 20    セプター結合活性を有するものなどが用いられる。

- 具体的には、配列番号：37または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様
- 25    に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明

のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1  
10 または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個（1  
15 または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。

20 本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドには、前記した本発明のレ  
25 セプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているも



の、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体（宿主は前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の宿主と同様のものなどが用いられる。）を前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の作製方法に準じて作製し、前述の本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体の培養方法に準じて培養することによっても製造することができる。また、前述のポリペプチド合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、前述の自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のレセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の合成は上述の本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩における合成方法と同様

の方法により合成することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチド  
5 としては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

10 本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase  
15 Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56  
25 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードす

るDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

配列番号：38、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAでコードされるポリペプチドは上述の本発明のポリペプチドの製造法と同様にして製造することができ、該ポリペプチドのアミド、エステル、塩は上述の本発明のポリペプチドのアミド、エステル、塩と同様のものなどがあげられる。

より具体的には、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：38で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：55または配列番号：56で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該D

NAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述  
5 した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。  
10 い。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、  
（１）配列番号：３８、配列番号：５５または配列番号：５６で表わされる塩基  
15 配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または（２）配列番号：３８、配列番号：５５または配列番号：５６で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性またはシグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するD  
20 NAなどが用いられる。

（１）本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（以下、これらを単に本発明のポリペプチドと略称することもある）は、プロラクチン分泌の調節作用、つまり、プロラクチン分泌の促進および抑制  
25 作用を有する。即ち、本発明のポリペプチドは、後述の実施例から明らかなように、まずプロラクチン分泌の促進作用を有するため、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。一方、本発明のポリ

ペプチドは、そのレセプター蛋白質との親和性が強いと、投与量が増えるとプロラクチン分泌に対し脱感作（desensitization）が起こる結果、プロラクチン分泌を抑制する作用も有する。この場合、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。

- 5 従って、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精嚢發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

- 10 さらに、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌促進作用に基づき、性欲促進作用（フェロモンの作用）を有するため、性欲促進剤としても有用である。

- また、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ・デル・カスティヨ  
15 （Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

また、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

- 20 その他、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

- 25 さらにまた、本発明のポリペプチドは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の發育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬としても有用である。

本発明のポリペプチドのプロラクチン分泌調節活性については、Neuroendocrinology, 62巻 1995年 198-206頁、または、Neuroscience Letters 203巻 1996年 164-170頁などに記載の方法またはそれに準じた方法により行うことができ、後述の実施例に記載した方法で行うことが望ましい。

- 5 本発明のポリペプチドを前述の医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該ポリペプチドまたはその塩を生理
- 10 学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンの
- 15 ような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料
- 20 にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

- 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、
- 25

非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート 80（<sup>TM</sup>）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、一般的に成人の甲状腺機能低下症患者（体重 60 kg に対し）においては、一日につき通常約 0.1 から 100 mg、好ましくは約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では成人の甲状腺機能低下症患者（体重 60 kg に対し）においては、一日につき通常約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（2）また、①本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、本発明のポリペプチドを含有してなる、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、または、

②本発明のポリペプチド、および本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（以下、本発明のレ

セプター蛋白質と略称することもある)を用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、本発明のポリペプチドおよび本発明のレセプター蛋白質を含有してなる、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩も、プロラクチン分泌の促進作用を有する場合は、プロラクチン分泌不全に関する各種疾患の予防および治療薬に用いることができ、プロラクチン分泌の抑制作用を有する場合は、プロラクチン過剰分泌に関する各種疾患の予防・治療薬に用いることができる。

- 10 得られる化合物またはその塩がプロラクチン分泌の促進作用を有する場合、プロラクチン分泌不全に関する各種疾患の予防および治療薬に用いることができ、

該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関する各種疾患の予防・治療薬として有用である。

さらに、該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌促進作用に基づき、性欲促進作用（フェロモンの作用）を有するため、性欲促進剤としても有用である。

- 一方、得られる化合物またはその塩がプロラクチン分泌の抑制作用を有する場合は、プロラクチン過剰分泌に関する各種疾患の予防・治療薬に用いることができ、

該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del  
25 Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌、リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関する各種疾患の予防・治療薬として有用である。



また、該化合物またはその塩は、プロラクチン分泌抑制作用に基づいて、避妊薬としても有用である。

その他、得られる化合物またはその塩は、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、ウシ、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

さらにまた、得られる化合物またはその塩は、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療薬としても有用である。

上記スクリーニング方法またはスクリーニングキットを用いて得られる化合物またはその塩のプロラクチン分泌調節活性については、Neuroendocrinology, 62巻 1995年 198-206頁、または、Neuroscience Letters 203巻 1996年 164-170頁などに記載の方法またはそれに準じた方法により行うことができ、後述の実施例に記載した方法で行うことが望ましい。

得られる化合物またはその塩を前述の医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような

膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、一般的に成人の甲状腺機能低下症患者（体重 60 kg に対し）においては、一日につき通常約 0.1 から 100 mg、好ましくは約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば

注射剤の形では成人の甲状腺機能低下症患者（体重 60 kg に対し）においては、一日につき通常約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

- 5    (3) 本発明のポリペプチドの活性を促進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法およびスクリーニング用キットについて以下に詳述する。

本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法は、好ましくは、本発明のポリペプチド、および本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質と略称することもある）を用いることを特徴とする、発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

10

該スクリーニング方法は、具体的には、(i) 本発明のポリペプチドに本発明のレセプター蛋白質を接触させた場合と、(ii) 本発明のポリペプチドに本発明のレセプター蛋白質および試験化合物を接触させた場合における、本発明のポリペプチドの活性を測定し、比較することにより行われる。

15

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、本発明のポリペプチドおよび試験化合物の細胞刺激活性または本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量などを測定して、比較することの特徴とするものである。本発明のポリペプチドの細胞刺激活性などは、自体公知の方法、例えば、Dockray, G. J. et al., Nature, 305, 328-330, 1983, Fukusumi, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 232, 157-163, 1997, Hinuma, S., et al., Nature, 393, 272-276, 1998, Tatemoto, K., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471-476, 1998. などに記載の方法あるいはそれに準じる方法などに従って測定することができる。

20

25

本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量の測定、細胞刺激活性の測定後述の方法またはそれらに準じた方法により行うことができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のポリペプチドを、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のポリペプチドの標品を調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどの、本発明のポリペプチドと本発明のレセプター蛋白質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

例えば、上記(ii)の場合における細胞刺激活性などが上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のポリペプチドの細胞刺激活性などを促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合における細胞刺激活性などが上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のポリペプチドの細胞刺激活性などを阻害する化合物として選択することができる。

また、これらの試験を行う前に、後述の「本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量の測定」に記載した①～③の方法またはそれに準じた方法により試験を行い、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認することが好ましい。

さらに、上記の試験化合物が本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩であることを判断する一つの指標としては、本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量と本発

明のポリペプチドの標識体との結合を阻害する活性があげられる。例えば、Hosoya, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194(1), 133-143, 1993に記載されているような結合試験系において、 $1 \times 10^{-2}$  M以下の濃度で標識体の結合を10%以上阻害する試験化合物は本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩である可能性が高いと考えられる。但し、結合阻害活性は標識体の結合をもとに測定した相対的な値であるため、上記の試験化合物が本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩であることを判断する上で必須ではない。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドを含有するものである。本発明のスクリーニング用キットは本発明のポリペプチドの受容体、即ち、本発明のレセプター蛋白質（具体的には、配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）をさらに含有するものが好ましい。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5% CO<sub>2</sub>、95% airで2日間培養したもの。

##### ③標識リガンド

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した本発明のポリペプチドの水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測

定用緩衝液にて  $1 \mu\text{M}$  に希釈する。

#### ④リガンド標準液

本発明のポリペプチドを  $0.1\%$  ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含む PBS で  $1\text{mM}$  となるように溶解し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存する。

### 5 2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現 CHO 細胞を、測定用緩衝液  $1\text{ml}$  で2回洗浄した後、 $490 \mu\text{l}$  の測定用緩衝液を各穴に加える。

②  $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$  の試験化合物溶液を  $5 \mu\text{l}$  加えた後、標識リガンドを  $5 \mu\text{l}$  1 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに  $10^{-3}\text{M}$  のリガンドを  $5 \mu\text{l}$  加えておく。

③ 反応液を除去し、 $1\text{ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを  $0.2\text{N NaOH}-1\%\text{SDS}$  で溶解し、 $4\text{ml}$  の液体シンチレーター A（和光純薬製）と混合する。

15 ④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式【数1】で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

20 B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、  
25 非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの活性（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

(4) 本発明のポリペプチドおよび試験化合物の本発明のレセプター蛋白質に対する結合量・細胞刺激活性の測定

- 5 本発明のレセプター蛋白質を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を
- 10 有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）の結合量・細胞刺激活性を測定することができる。

- 該測定方法においては、本発明のレセプター蛋白質と試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該本発明のレセプター蛋白質に対する試験化合物の結合量や、
- 15 細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、

- ①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とする測定方法、
- 20 ②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする測定方法、
- ③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質
- 25 に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とする測定方法、
- ④試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合に

における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を  
5 測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキド  
10 ン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）の測定方法によることを特徴とする。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に  
15 結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、本測定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、  
20 該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現さ  
25 せるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus ; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロ



チオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、該測定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

- 10 該測定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

- 本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、  
15 昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

- 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量

は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

- 5      上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 10      標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。
- 15  
20

- 25      具体的には、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10 (望ましくはpH6～8) のリン酸バッフ

ァー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王ーアトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>Sなどで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明のポリペプチドの活性を促進する化合物として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドを決定する上記の④~⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って

- 定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞
- 5 に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

該測定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

10 1. 測定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

- 15 孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個／穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

- 20 市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

- 25 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5 $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を

5 知るためには非標識試験化合物を5 $\mu$ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定  
10 する。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものと

15 する。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

20 G : グアニン

C : シトシン

I : イノシン

R : アデニン (A) またはグアニン (G)

Y : チミン (T) またはシトシン (C)

25 M : アデニン (A) またはシトシン (C)

K : グアニン (G) またはチミン (T)

S : グアニン (G) またはシトシン (C)

	W	: アデニン (A) またはチミン (T)
	B	: グアニン (G) 、 グアニン (G) またはチミン (T)
	D	: アデニン (A) 、 グアニン (G) またはチミン (T)
	V	: アデニン (A) 、 グアニン (G) またはシトシン (C)
5	N	: アデニン (A) 、 グアニン (G) 、 シトシン (C) もしくはチミン (T) または不明もしくは他の塩基
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
10	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
15	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	BHA	: ベンズヒドリルアミン
	pMBHA	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	Bzl	: ベンジル
20	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
	DCM	: ジクロロメタン
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
25	TFA	: トリフルオロ酢酸
	DEA	: ジイソプロピルエチルアミン
	Gly	: グリシン

	A l a	またはA	: アラニン
	V a l	またはV	: バリン
	L e u	またはL	: ロイシン
	I l e	またはI	: イソロイシン
5	S e r	またはS	: セリン
	T h r	またはT	: スレオニン
	C y s	またはC	: システイン
	M e t	またはM	: メチオニン
	G l u	またはE	: グルタミン酸
10	A s p	またはD	: アスパラギン酸
	L y s	またはK	: リジン
	A r g	またはR	: アルギニン
	H i s	またはH	: ヒスチジン
	P h e	またはF	: フェニルアラニン
15	T y r	またはY	: チロシン
	T r p	またはW	: トリプトファン
	P r o	またはP	: プロリン
	A s n	またはN	: アスパラギン
	G l n	またはQ	: グルタミン
20	p G l u		: ピログルタミン酸

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

後述の参考例1で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

25 〔配列番号：2〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

後述の参考例1で用いられるプライマーF5の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

後述の参考例1で用いられるプライマーF6の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：5〕

後述の参考例1で用いられるプライマーF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

後述の参考例1で用いられるプライマーR5の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

10 後述の参考例3で用いられるプライマーhR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

後述の参考例3で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

〔配列番号：9〕

15 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

後述の参考例4で用いられるプライマーbF6の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

20 後述の参考例4で用いられるプライマーbF7の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

後述の参考例4で用いられるプライマーbR6の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

後述の参考例4で用いられるプライマーbR7の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：14〕

後述の参考例4で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ウシ型）を示す。



〔配列番号：15〕

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

- 5 後述の参考例5で用いられるプライマーrLPR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

後述の参考例5で用いられるプライマーrLPF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

- 10 後述の参考例5で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（ラット型）を示す（リクローニング前）。

〔配列番号：19〕

配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

- 15 RFGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

RFGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

RSKG配列をコードする塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：23〕

RSGR配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

RLGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

- 25 RLGK配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

後述の参考例6で用いられるプライマーFF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

後述の参考例6で用いられるプライマーrR4の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

後述の参考例6で用いられるプライマーmF1の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：29〕

後述の参考例6で用いられるプライマーmF3の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

後述の参考例6で用いられるプライマーmR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

10 後述の参考例6で用いられるプライマーmoFの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

後述の参考例6で用いられるプライマーmoRの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

15 後述の参考例6で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（マウス型）を示す。

〔配列番号：34〕

配列番号：33で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

20 後述の参考例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022LをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

25 後述の参考例7で得られたラット脳幹周辺部由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022LをコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

後述の参考例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 0 2 2 L のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕

- 5 後述の参考例 7 で得られたラット脳幹周辺部由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 r O T 7 T 0 2 2 L をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

後述の参考例 7 (3) で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：40〕

後述の参考例 7 (4) で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

- 10 〔配列番号：41〕

後述の参考例 7 (5) で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 8 1 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：43〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 0 1 番目 (Ser) ～第 1 1 2 番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

- 20 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 2 4 番目 (Val) ～第 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 番目 (Met) ～第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

- 25 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の、第 1 番目 (Met) ～第 1 1 2 番目 (Ser) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の、第1番目 (Met) ～131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

参考例5 で用いられたプライマーratF2の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：49〕

参考例5 で用いられたプライマーratRの塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

後述の参考例5 で得られた本発明のポリペプチドのアミノ酸配列 (ラット型) を示す (リクローニング後)。

10 〔配列番号：51〕

配列番号：50 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

参考例9 で用いられたプライマーbFFの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：53〕

参考例9 で用いられたプライマーbFRの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

参考例11 で得られたh0T7T022 で表されるタンパク質 (ポリペプチド) をコードするアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：55〕

配列番号：54 で表されるアミノ酸配列を有するh0T7T022 で表されるタンパク質 (ポリペプチド) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

25 配列番号：54 で表されるアミノ酸配列を有するh0T7T022 で表されるタンパク質 (ポリペプチド) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕

参考例11 で用いられたプライマー1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：58〕

参考例11で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

実施例4で用いられたプライマー#1の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：60〕

実施例4で用いられたプライマー#2の塩基配列を示す。

〔配列番号：61〕

実施例4で用いられたプライマー#3の塩基配列を示す。

〔配列番号：62〕

10 実施例4で用いられたプライマー#4の塩基配列を示す。

後述の参考例2で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/phRF1 は、  
1999年4月14日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6702として、財団法人発酵研究所（IFO）に1999年3月5日から寄託番号 IFO 16265として寄託されている。

15 後述の参考例7で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)  
DH10B/pAK-rOT022Lは、1998年11月2日から通商産業省  
工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6  
558として、1998年10月16日から財団法人・発酵研究所（IFO）に  
20 寄託番号 IFO 16211として寄託されている。

後述の参考例9で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pbRF2 は、1  
999年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-6811として、財団法人発酵研究所（IFO）  
に1999年6月18日から寄託番号 IFO 16288として寄託されてい  
25 る。

後述の参考例8で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/phRF2 は、1  
999年8月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIB

H) に寄託番号 FERM BP-6812 として、財団法人発酵研究所 (IFO) に 1999 年 6 月 18 日から寄託番号 IFO 16289 として寄託されている。

後述の参考例 6 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pmLP4 は、  
5 1999 年 8 月 2 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6813 として、財団法人発酵研究所 (IFO) に 1999 年 6 月 18 日から寄託番号 IFO 16290 として寄託されている。

後述の参考例 5 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/prLPL6 は、  
10 1999 年 8 月 2 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6814 として、財団法人発酵研究所 (IFO) に 1999 年 6 月 18 日から寄託番号 IFO 16291 として寄託されている。

後述の参考例 11 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  /  
15 pCR2.1-hOT022T は、1999 年 11 月 8 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6930 として、財団法人発酵研究所 (IFO) に 1999 年 10 月 27 日から寄託番号 IFO 16330 として寄託されている。

後述の参考例 11 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  /  
20 pCR2.1-hOT022G は、1999 年 11 月 8 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6931 として、財団法人発酵研究所 (IFO) に 1999 年 10 月 27 日から寄託番号 IFO 16331 として寄託されている。

後述の実施例 5 で得られた形質転換体 *Escherichia coli*  
25 MM294 (DE3)/pTFCRFRP-1 は、2000 年 9 月 28 日から通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に受託番号 FERM BP-7313 として、財団法人発酵研究所 (IFO) に 2000 年 9 月 19 日から寄託番号 IFO 164

76として寄託されている。

後述の参考例12で得られた用いて抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体、IF3は、2001年2月21日から経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH)に受託番号FERM BP-7463として、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年1月16日から寄託番号IFO 50527として寄託されている。

#### 実施例

以下に、参考例および実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

参考例1 ヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分からのcDNAの合成とRT-PCR法による生理活性ペプチドcDNAの増幅

クローンテック社より購入したヒト胎児脳poly(A)<sup>+</sup>RNA画分1μgにプライマーとしてOligodTプライマー(GibcoBRL社)を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素(GibcoBRL社)により、添付バッファーを用いてcDNAを合成した。反応後の産物はフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30μlのTEに溶解した。調製したcDNA 1μlを鋳型として、次の2つのプライマー(F5およびF6)を用いて、PCRによる増幅を行った。

F5: 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' (配列番号: 3)

F6: 5'-CTAGACCACCTCTATATAACTGCCCAT-3' (配列番号: 4)

反応液の組成は、合成DNAプライマー(F5およびF6)各20pM、0.25mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5μlおよび酵素に付属のバッファー5μlで、総反応溶液量は50μlとした。増幅のための

サイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー）を用い98℃・10秒、63℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。

さらにそのPCR産物の1 $\mu$ lを鋳型として次の2つのプライマー（F1およびR5）を用いて、nested PCRによる増幅を行った。

5 F1 : 5'-GCACATAGAGACTTAATTTTAGATTAGAC-3'（配列番号：5）

R5 : 5'-CATGCACTTTGACTGGTTTCCAGGTAT-3'（配列番号：6）

反応液の組成は、合成DNAプライマー（F1およびR5）各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5  $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファー5  $\mu$ lで、総反応溶液量は50  $\mu$ lとした。増幅のための  
10 サイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

参考例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入  
15 cDNA部分の塩基配列の解読による新規生理活性ペプチド候補クローンの選択

参考例1で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quiagen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター  
20 pCR<sup>TM</sup>2.1へサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell（宝酒造）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア  
25 コリ（Escherichia coli）JM109/p hRF1を得た。

個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの



一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、  
5 光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用いて行った。決定した塩基配列を図1に示した。

決定した塩基配列を図1をもとにホモロジー検索と配列の解析を行った結果、形質転換体E.coli JM109/p hRF1の保有するプラスミドに挿入された  
10 cDNA断片は、新規生理活性ペプチドをコードすることが分かった。

### 参考例3 ヒト胎児脳cDNAからの生理活性ペプチドcDNAのスプライシングバリエーションの取得

参考例1で作製したヒト胎児脳cDNA 1 mlを鋳型として、次の二つのプライマー  
15 ー (F5、hR1)を用いてPCRによる増幅を行った。

F5: 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' (配列番号: 3)

hR1: 5'-CAGCTTTAGGGACAGGCTCCAGGTTTC-3' (配列番号: 7)

反応液の組成は合成プライマー (F5およびhR1) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は50 mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー)を用い、  
20 98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit (Quiagen)を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応は  
25 BigDye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (ABI)を用いて行い、蛍光式自動Sequencer (ABI377)を用いて解読した。得られた塩基配列の情報解析はDNASIS (日立システムエンジニアリング)を用いて行った。その結果、参考例2で得ら

れたcDNAと3'末端側が異なるcDNAが得られた。したがって本参考例で得られたcDNAは、参考例2で得られたcDNAのスプライシングバリエーションである事が分かった。決定した塩基配列（配列番号：9）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：8）を図3に示す。

5

#### 参考例4 ウシ視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ウシ視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAからのウシ型生理活性ペプチドcDNAの取得は Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製した牛視床下部cDNAを鋳型として、次の4つのプライマー（bF6、bF7、bR6、bR7）を合成し、Kit添付のAP1、AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

- 10 bF6: 5'-GCCTAGAGGAGATCTAGGCTGGGAGGA-3' (配列番号: 10)  
bF7: 5'-GGGAGGAACATGGAAGAAGAAAGGAGC-3' (配列番号: 11)  
bR6: 5'-GATGGTGAATGCATGGACTGCTGGAGC-3' (配列番号: 12)  
15 bR7: 5'-TTCCTCCCAAATCTCAGTGGCAGGTTG-3' (配列番号: 13)

5'側（N末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー（bR6とAP1）を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃10  
20 秒、72℃2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bR7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増  
25 幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。

3'側 (C末領域) の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー (bF6 とAP1) を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして (bF7とAP2) プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0.25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応は Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (ABI) を用いて行い、蛍光式自動Sequencer (ABI377) を用いて解読した。

得られた塩基配列の情報解析はDNASIS (日立システムエンジニアリング) を用いて行った。決定した塩基配列 (配列番号: 15) と予測されるアミノ酸の配列 (配列番号: 14) を図4に示す。

#### 参考例5 ラット脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ラット脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからのラット型生理活性ペプチドcDNAの取得はMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製したラット脳cDNAを鋳型として、次の2つのプライマー

rLPR1: 5'-CCCTGGGGCTTCTCTGTCTTCTATGT-3' (配列番号: 16)

rLPP1: 5'-AGCGATTCATTTTATTGACTTTAGCA-3' (配列番号: 17)

を合成し、Kit添付のAP1, AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

5'側（N末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPF1とAP1のプライマーセットを用いて行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq DNA polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にして一回目のプライマーセット、同様の反応液組成にて二回目のPCRを行った。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、（68℃・2分30秒）のサイクルを38回くりかえした。

3'側（C末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPF1とAP1のプライマーセットを用いて行った。反応液組成は5'側（N末領域）の増幅の場合と同様とした。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・2分のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にしてrLPF1とAP2プライマーにて二回目のPCRを行った。反応液組成は一回目のPCRと同様とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・2分のサイクルを38回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物バンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は参考例3と同様の方法で行った。決定した塩基配列（配列番号：19）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：18）を図5に示す。さらにこの配列をもとに、開始コドンと終止コドンの周辺に2本のプライマー

ratF2 : 5'-AATGGAAATTATTTTCATCAAAGCGATTTCAT-3' (配列番号 : 48)

ratR : 5'-CACCTATACTGACAGGAATGATGGCTCTCC-3' (配列番号 : 49)

を合成した。ラット視床下部poly(A)<sup>+</sup>RNAよりAMV reverse transferase (宝酒造) とrandom 9 mer (宝酒造)を用いて合成したcDNAを鋳型として98℃・10秒、68℃・40秒のサイクルを33回くりかえすPCR反応を行った。さらにこの反応液を鋳型として98℃・10秒、68℃・1分のサイクルを38回くりかえすPCR反応を行い、約690bpのPCR産物を得た。これをTA cloning Kit (Invitrogen) のマニュアルにしたがってクローニングベクターpCR2.1 TOPOへ導入、大腸菌JM109に導入して形質転換体E. coli JM109/prLPL6を得た。参考例3と同様の方法で塩基配列を決定し(配列番号 : 51)、アミノ酸配列(配列番号 : 50)を予測した。

参考例6 マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからのMarathon PCR法によるマウス型生理活性ペプチドcDNAの取得と配列確認

マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAからマウス型生理活性ペプチドcDNAを取得するため、まずマウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNA 1 μgをoligo d(T) primer 2.5 pmol (宝酒造)、0.5 mM dNTPs、10 mM DTT存在下で、SuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素 (GIBCO BRL) により、42℃、1時間の反応でcDNAを合成した。これを鋳型として、プライマーFF2 : 5'-GACTTAATTTTAGATTAGACAAAATGGAA-3' (配列番号 : 26)

rR4 : 5'-TTCTCCCAAACCTTTGGGGCAGGT-3' (配列番号 : 27)

および、KlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10秒、56℃ 20秒、72℃ 25秒のサイクルを39回くりかえすPCR反応を行った。さらに同じプライマーセットを用いて98℃ 10秒、60℃ 20秒、72℃ 25秒のサイクルを25回くりかえすPCR反応を行い、増副産物を2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出して、そのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、参考例3と同様の方法で塩基配列を決定した。得られたマウス型生理活性ペプチドcDNA断片の5'および3'側の配列を取得するため、

参考例5と同様に、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いてマウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNA 1  $\mu$ g から cDNA を合成し、鋳型とした。次の3つのプライマー

mF1 : 5'-ACAGCAAAGAAGGTGACGGAAAATACTC-3' (配列番号 : 28)

5 mF3 : 5'-ATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGACGAC-3' (配列番号 : 29)

mR1 : 5'-GTGCTGCGGGCTTCTTTCTCATCTAT-3' (配列番号 : 30)

を合成し、kit付属のAP1プライマーと組み合わせてPCRを行った。

5'側 (N末領域) の増幅のために、まず一回目のPCR反応をmR1とAP1のプライマーセットを用いて行った。3'側 (C末領域) の増幅のためには、一回目のPCR反応をmF1とAP1のプライマーセットで行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルは98℃ 10秒、72℃ 2分のサイクルを5回、続いて98℃ 10秒、70℃ 2分のサイクルを5回、98℃ 10秒、68℃ 2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を鋳型にして二回目のPCRを行った。5'側の増幅は一回目と同様のプライマーセット、3'側の増幅はmF3とAP1プライマーセットを用い、一回目のPCRと同様の反応液組成で反応液を調製した。PCR反応は98℃ 10秒、72℃ 2分のサイクルを5回、続いて98℃ 10秒、70℃ 2分のサイクルを5回、98℃ 10秒、68℃ 2分30秒のサイクルを38回くりかえした。

5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物のバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は参考例3と同様の方法で行った。

さらに得られた配列をもとに2つのプライマー

moF : 5'-TTTAGACTTAGACGAAATGGA-3' (配列番号 : 31)

25 moR : 5'-GCTCCGTAGCCTCTGAAGTC-3' (配列番号 : 32)

を合成し、先に示した、マウス脳poly(A)<sup>+</sup>RNAよりSuperScriptII RNase H<sup>-</sup> 逆転写酵素で合成したcDNAを鋳型としてPCRを行い、マウス型生理活性ペプチド全長

cDNAを含む断片を増幅した。反応はKlenTaq DNA polymerase (Clontech) を用いて、98℃ 10秒、56℃ 20秒、72℃ 15秒のサイクルを35回くりかえした。約600bpの増副産物を2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって検出し、そのバンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製、クローニングベクター pCR2.1-TOPO (TOPO TA cloning kit, Invitrogen) へサブクローニング、大腸菌JM109へ導入し、形質転換体E. coli JM109/ pmLP4を得た。参考例3と同様の方法で塩基配列を解析し、決定した塩基配列（配列番号：34）と予測されるアミノ酸配列（配列番号：33）を図7に示す。

#### 10 参考例7

（1）ラット脳幹周辺部のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラット脳幹周辺部cDNAを鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（配列番号：35）およびプライマー2（配列番号：36）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1（配列番号：35）およびプライマー2（配列番号：36）を各0.2μM、dNTPs 200μM、および酵素に添付のバッファーを加え、50μlの液量とした。PCR反応は、① 94℃・2分の後、② 94℃・30秒、72℃・2分のサイクルを3回、③ 94℃・30秒、68℃・2分のサイクルを3回、④ 94℃・30秒、64℃・30秒、68℃2分のサイクルを3回繰り返し、⑤ 最後に68℃・8分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDN

A配列（配列番号：38）を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列（配列番号：37）を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をrOT7T022Lと命名した。

- 5 本発明のラット脳幹周辺部由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022LをコードするcDNA（配列番号：38）がサブクローニングされたプラスミドpAK-rOT022Lを、自体公知の方法に従い大腸菌（*Escherichia coli*）DH10Bに導入して、形質転換体：大腸菌（*Escherichia coli*）DH10B/pAK-rOT022Lを得た。

- 10 （2）G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T022L発現CHO細胞の樹立

- 直径10cmの組織培養用シャーレに $1 \times 10^6$ 個のCHOdhfr<sup>-</sup>細胞を播種し、24時間培養した。（1）で得られたrOT7T022L発現ベクターpAK-rOT022Lを20 $\mu$ g用い、リボソーム法による遺伝子導入キット  
15 （ジーントランスファー、ニッポンジーン社）を用いて、DNA・リボソームの複合体を形成させた。培地を新鮮なものに交換し、これにDNA・リボソームの複合体を添加して一晩インキュベートした。培地を新鮮なものと交換してさらに1日間培養した後、形質転換体選択用の培地に交換して2日間培養した。さらに、トリプシン-EDTA処理によってシャーレ内の細胞を回収し、細胞密度が希薄  
20 な状態にて再培養を行うことによって、形質転換体の割合の増加を図った。これにより、rOT7T022Lを安定に高発現する細胞株CHO-rOT7T022Lのクローンを得た。

- （3）Met-Pro-His-Ser-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：3  
25 9）の合成

市販p-メチルBHA樹脂（アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製）0.5 mmole分をペプチド合成機（アプライド バイオシテムズ社製43



- 0 A) の反応器に入れ、DCMで膨潤させた後、最初のアミノ酸Boc-PheをHOBt/DCC法で活性化しp-メチルBHA樹脂に導入した。樹脂を50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミノ酸Boc-Arg(Tos)をHOBt/DCC法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Leu、Boc-Pro、Boc-Leu、Boc-Asn、Boc-Ala、Boc-Phe、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Pro、Boc-Metを順次縮合した。

- 全配列アミノ酸が導入され樹脂を50%TFA/DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥し  
10 Met-Pro-His(Bom)-Ser(Bzl)-Phe-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.73gを得た。

- この樹脂0.25gをp-クレゾール5.1g、弗化水素15mlと共にテフロン製弗化水素反応装置中で0℃・60分間反応させた。弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテル100mlを加え攪拌後、ガラスフィルター上に濾取、乾燥した。  
15 これを50%酢酸水溶液50ml中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約5mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25(2x90cm)のカラムに付し50%酢酸水で展開し主要画分を集め凍結乾燥した。次にこの粗精製ペプチドを5%チオグリコール酸/50%酢酸1.5mlに溶解し、50℃12時間保持しMet酸化体ペプチドを還元した後、LiChroprep(商品名)RP-18(MERCK社製)  
20 を充填した逆相系カラムにつけ0.1%TFA水と0.1%TFA含有33%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度27%前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末26mgを得た。  
質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 1428.7 (理論値 1428.8)

HPLC溶出時間 18.0分

- 25 カラム条件

カラム: Wakosil(商品名) 5C18 (4.6x100mm)

溶離液: A液(0.1%TFA含有5%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

5 (4) Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 40) の合成

上述の参考例7(3)と同様にして、Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Gln, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Pro, Boc-Val を順次縮合し、Boc-Val-Pro-Asn-Leu-Pro-Gln-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 0.43gを得た。この樹脂0.22gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物46mg

10 を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 969.5 (理論値 969.6)

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム: Wakosil (商品名) 5C18 (4.6 x 100mm)

15 溶離液: A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

20 (5) Ser-Ala-Gly-Ala-Thr-Ala-Asn-Leu-Pro-Arg-Ser-NH<sub>2</sub> (配列番号: 41) の合成

上述の参考例7(3)と同様にして、Boc-Ser(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Asn, Boc-Ala, Boc-Thr(Bzl), Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Ser(Bzl) を順次縮合し、

25 Boc-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Ala-Thr(Bzl)-Ala-Asn-Leu-Pro-Leu-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-pMBHA-resin 0.62gを得た。この樹脂0.23gを同様に弗化水素処理、カラムクロマト精製し白色粉末の目的物71mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1156.4 (理論値 1156.6)

HPLC溶出時間 11.8分

カラム条件

カラム: Wakosil (商品名) 5C18 (4.6 x 100mm)

- 5 溶離液: A液 (0.1% TFA含有5%アセトニトリル水)  
B液 (0.1% TFA含有55%アセトニトリル水) を用い  
A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

- 10 (6) r0T7T022L (配列番号: 37) とペプチドMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39) およびペプチドVPNLPQRFamide (配列番号: 40) のサイトセンサーによる反応実験

上述の参考例7(2)で得られたr0T7T022L受容体発現CHO細胞を、 $2.7 \times 10^5$  cells/capsuleの密度でサイトセンサー用カプセルに播種し、一晚培養した後

- 15 にサイトセンサーのワークステーションに装着した。サイトセンサーの流路にセットしたアッセイ用の培地 (0.1%のウシ血清アルブミンを含有するlow buffered RPMI1640 medium) を、ポンプON (80秒間) ポンプOFF (40秒間) のサイクルで細胞に供給し、各サイクルごとにポンプ停止8秒後から30秒間の細胞外pHの変化率をacidification rateとして算出した。acidification rateの経時変化  
20 をモニターし、安定した値を示すようになったところで流路の切り換えによって細胞に各ペプチドを7分2秒間暴露した。各ウェルのAcidification Rateの値をペプチドを暴露する直前の3サイクルの値を100%として標準化し、細胞の反応の比較を行なったところ、r0T7T022L発現CHO細胞はペプチドMPHSFANLPLRFamide (配列番号: 39) およびペプチドVPNLPQRFamide  
25 ide (配列番号: 40) に対して強く用量依存的な反応を示す事が明らかになった (図8)。

参考例 8 ヒト新規生理活性ペプチド候補スプライシングバリエーションcDNAを保持する形質転換体の作成

上記参考例 3 で行った PCR 後の反応産物は 1.2% のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさの DNA 断片の増幅を確認した後、Quiagen PCR purification kit (Quiagen) を用いて DNA を回収した。TA クローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収した DNA をプラスミドベクター pCR<sup>TM</sup>2.1 へサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換したのち、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTG および X-gal を含む LB 寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミド DNA を調製した。調製した DNA の一部を用いて EcoRI による切断を行い、挿入されている cDNA 断片の大きさを確認した。残りの DNA の一部をさらに RNase 処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI 社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p hRF2 を得た。

20

参考例 9 ウシ新規生理活性ペプチド cDNA を保持する形質転換体の作成

参考例 4 で作製したウシ視床下部 cDNA 1 ml を鋳型として、次の二つのプライマー (bFF、bFR) を用いて PCR による増幅を行った。

bFF: 5'-TTCTAGATTTTGGACAAAATGGAAATT-3' (配列番号: 52)

25 bFR: 5'-CGTCTTTAGGGACAGGCTCCAGATTTC-3' (配列番号: 53)

反応液の組成は合成プライマー (bFF および bFR) 各 20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 ml および酵素に付属のバッファーで総反応液量は 50 ml

とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。参考例3で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター pCR™2.1へサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell（宝酒造）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAを用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。さらに調製したDNAをRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）JM109/pbRF2を得た。

20

参考例10 ペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）およびペプチドVPNLQPQRFamide（配列番号：40）のrOT7T022L（配列番号：37）発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性

参考例7（3）および（4）で合成したペプチドMPHSFANLPLRFamide（配列番号：39）、VPNLQPQRFamide（配列番号：40）がrOT7T022L受容体に対して特異的に反応することが参考例7（6）のサイトセンサーによる実験で確認できた。次に上述したペプチドのrOT7T022L発現CHO細胞に対するcAMP産生抑制活性の測

25

定を行った。

参考例 7 (2) で得られた rOT7T022L 発現 CHO 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well の濃度で 24well プレートに巻き、37 度で 2 日間培養した。ハンクスバッファー (HBSS) に 0.05% BSA と 0.2mM IBMX を加えたバッファーで細胞を洗浄したのち、同じバッ  
5      ファーで 30 分間 37 度で放置した。30 分後細胞を上記のバッファーに Forskolin  $10^{-6}$  M を加えたアッセイバッファーと同時にさまざまな濃度の上述したペプチドを添加し、37 度 30 分間インキュベーションをした。

30 分後各 well の細胞内の cAMP 濃度を cAMP EIA Kit (アマシャム社) の方法にしたがって測定した。その結果、図 9 に示すようにペプチド MPHSFANLPLRFamide (配  
10      列番号: 39)、VPNLPQRFamide (配列番号: 40) は rOT7T022L 受容体発現 CHO 細胞に対して cAMP 産成抑制効果を示し、その  $IC_{50}$  値はそれぞれ 0.5nM、0.7nM と非常に低濃度で強い効果を示した。

参考例 11    ヒト視床下部の G 蛋白質共役型 レセプター蛋白質をコードする  
15      cDNA のクローニングと塩基配列の決定

ヒト視床下部 cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、2 個のプライマー、  
プライマー 1: 5'- GTCGACATGG AGGGGAGCC CTCCCAGCCT C -3' (配列番号: 57)  
およびプライマー 2: 5'- ACTAGTTCAG ATATCCCAGG CTGGAATGG -3' (配列番号: 58)  
を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA を 10 分の  
20      1 量を鋳型として使用し、Advantage-HF Polymerase Mix (CLONTECH 社) 1/50 量、プライマー 1 (配列番号: 57) およびプライマー 2 (配列番号: 58) を各  $0.2 \mu\text{M}$ 、dNTPs  $200 \mu\text{M}$ 、Dimethyl Sulfoxide 4%, および酵素に添付のバッファーを加え、 $25 \mu\text{l}$  の液量とした。PCR 反応は、①  $94^{\circ}\text{C} \cdot 2$  分の後、②  $94^{\circ}\text{C} \cdot 20$  秒、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 1$  分 30 秒のサイクルを 3 回、③  $94^{\circ}\text{C} \cdot 20$  秒、 $67^{\circ}\text{C} \cdot 1$  分 30 秒のサイクル  
25      を 3 回、④  $94^{\circ}\text{C} \cdot 20$  秒、 $62^{\circ}\text{C} \cdot 20$  秒、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 68^{\circ}\text{C} \cdot 1$  分 30 秒のサイクルを 38 回繰り返す、最後に  $68^{\circ}\text{C} \cdot 7$  分の伸長反応を行った。該 PCR 反応後の反応産物を TA クローニングキット (Invitrogen 社) の処方に従いプラスミドベクター pCR2.1

(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号: 55および56)を得た。これら2種類の配列は、第597残基で  
5 一塩基異なるが、導き出されるアミノ酸配列は同一(配列番号: 57)であり、このアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をhOT7T022と命名した。また2種類の形質転換体は大腸菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  / pCR2.1-hOT022T(配列番号: 55で表されるcDNAを含有する)、ならびに(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  / pCR2.1-hOT022G(配列番号: 56で表されるcDNA  
10 Aを含有する)と命名した。

#### 参考例12 抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体の作製

ラット型RFRP-1のC末端12アミノ酸(C末端のカルボキシル基がアミド化されたもの: 配列番号50で表されるアミノ酸配列の第83番目(Va1)~第9  
15 4番目(Phe)のアミノ酸配列)のN末端にCys一残基を付加したペプチド(C-VPHSAANLPLRF-NH<sub>2</sub>)を抗原としたモノクローナル抗体を作製した。抗原ペプチド0.6mgをウシ血清アルブミン(BSA)にマレイイミドを用いてコンジュゲートした。このコンジュゲート100 $\mu$ gをマウスの皮下に三回注射することにより免疫した後、最終免疫としてコンジュゲート50 $\mu$ gを尾静脈に注射して免疫した。最終  
20 免疫の四日後、マウスより脾臓細胞を採取し、マウスミエローマ細胞(P3-X63Ag8-U1: Matsumoto et al, BBRC (1999) vol. 257, 264-268)とポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。細胞融合後、ハイブリドーマ細胞、1F3を選択し、INTREGRA CL-1000を用いた大量培養にて、1F3の培養上清を得た。この培養上清より、HiTrap rProtein A column (Pharmacia)を用いて抗ラット型RFRP-1  
25 モノクローナル抗体を得た。Mouse mAb isotyping kit (Amersham)を用いて調べたところ、このモノクローナル抗体のサブタイプはIgG1  $\kappa$  chainであった。

### 参考例 1 3 競合的EIAの構築

まず、参考例 1 2 において抗原としたペプチドをマレイイミドを用いて西洋ワサビペルオキシターゼ(HRP)にコンジュゲートし、HRP-rat RFRP-1を作製した。

このHRP-rat RFRP-1と参考例 1 2 で得られた抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体を用いて競合的EIAを構築した。

抗マウスIgGAM (Cappel) 1.5  $\mu$ g/wellでコートし、Block ACE (大日本製薬)でブロッキングした96穴プレート各穴にバッファー(2mM EDTA、0.4% BSA、0.1 M NaCl、0.1% micro-0-protectを含む生理的リン酸バッファー(PBS))で希釈した抗ラット型RFRP-1モノクローナル抗体50  $\mu$ lを加え、同じバッファーに溶解したサンプル50mlも加えた。4℃にて16時間インキュベートした後、バッファーで希釈したHRP-rat RFRP-1 50  $\mu$ lを各穴に加えた。室温で2時間インキュベートした後、0.1% Tween20 (Sigma)を含むPBSでプレートを洗浄した後、各穴に結合したHRPの活性を TMB microwell peroxidase system (Kirkegaard & Perry Labs)を用いて呈色反応にて検出し450nmにおける吸光度を測定した。RFRP-1関連ペプチドをサンプルとして加えた時の吸光度の変化を図 1 1 に示す。

### 実施例 1 リガンドポリペプチドが血漿中下垂体ホルモン量に及ぼす影響

配列番号：3 9 で表わされるペプチドの第三脳室内投与が血漿中の下垂体ホルモン量に及ぼす影響を検討した。成熟Wistar系雄性ラット(手術時体重：約290～350 g)をペントバルビタール50 mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから3.3 mm低くした。頭蓋骨を露出し、ガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲の一ヶ所にアンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニューレ、AG-12 (内径0.4 mm、外径0.5 mm、エイコム社)を、その先端が第三脳室の上部に位置するように挿入した。定位座標は、PaxinosとWatson (1986) のアトラスに従い、AP：+7.2 mm (インターオーラルラインより)、L：0.0 mm、H：+2.0 mm (インターオーラルラインより)



とした。ガイドカニューレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニューレにはステンレス製ダミーカニューレ、AD-12（外径0.35mm、エイコム社）を挿入し、キャップナット（エイコム社）で固定した。術後、ラットを個別のケージで1週間以上飼育し、術後の回復を待ってから、実験を行った。

- 実験を行う前日に上記手術を施したラットをペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、解剖用パッドの上に背位に固定した。右側の頸静脈にカテーテル（SP35, 夏目製作所）を挿入した。翌日、頸静脈カテーテルから400 $\mu$ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を20 $\mu$ l入れておいた。ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニューレを取り外し、代わりにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは配列番号：39で表わされるペプチドを溶解させたPBSを5 $\mu$ l/分の流速で計10 $\mu$ lを第三脳室に注入した。注入終了後1分間待ってからマイクロインジェクションカニューレを取り外し、再びダミーカニューレをキャップナットで固定した。
- 脳室内投与を開始する直前、および脳室内投与の開始時点から10、20、30、40、60分後に頸静脈に挿入したカニューレより400 $\mu$ lずつ採血した。採取した血液は微量高速冷却遠心機（MR-150, トミー精工）を用いて遠心（5,000rpm、10分間）し、上清（血漿）を回収した。血漿中に含まれるプロラクチン量をラジオイムノアッセイを用いて測定した。
- 結果は、平均値 $\pm$ S. E. M. で表した。配列番号：39で表わされるペプチドを溶解させたPBS投与群とPBSのみを投与した対照群との間に有意差があるか否かの検定には Student's t-testを用いた。判定は、両側検定で危険率

5 %以下を統計的に有意であるとした。図10に示すごとく、血漿プロラクチン量は、10 nmolの配列番号：39で表わされるペプチドを第三脳室に投与後10分から増加傾向があり、20、30、40分において有意に増加した。また、投与60分後でも対照群との間に有意な差が認められた。また、血漿中GH、LH、  
5 ACTH、TSH量は有意な変化を示さなかった。

## 実施例2 ウシ視床下部からの内因性RFRP-1の精製

参考例13で構築した競合的EIAでウシ視床下部からのペプチド粗画分にRFRP-1様免疫活性が見いだされた。このRFRP-1様免疫活性を指標に、ウシ視床下部より内因性のRFRP-1を精製した。  
10

まず、凍結保存されたウシ視床下部2.0kgを超純水（ミリQ水）中で煮沸し、酢酸を1Mとなるように加え、ポリトロンでホモジナイズした。一晚攪拌した後、遠心にて上清を得た。上清にトリフルオロ酢酸（TFA）を0.05%となるように加え、C18カラム（Prep C18 125 Å; Waters）にアプライした。カラムに結合したペプチドを0.5%TFAを含む10、30、50%アセトニトリルでステップワイズに溶出した。30%アセトニトリル画分を二倍量の20mM酢酸アンモニウム（pH4.7）で希釈し、イオン交換カラム HiPrep CM-Sepharose FF（Pharmacia）にアプライした。イオン交換カラムに結合したペプチドを10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム（pH4.7）中の0.1、0.2、0.5、1.0M NaClでステップワイズに溶出した。もっとも  
15 多くRFRP-1様免疫活性が含まれていた0.1M NaCl画分に3倍量の冷アセトンを加え、遠心にて沈殿を除き上清をエバポレートにて濃縮した。濃縮された上清に0.1%となるようTFAを加え、逆相HPLCカラム RESOURCE RPC（Pharmacia）にてさらなる分離を行った。RESOURCE RPCの分離は10-30%アセトニトリルの濃度勾配で行い、主たるRFRP-1様活性は、およそ22%アセトニトリルで溶出された。この  
25 活性画分を10%アセトニトリルを含む20mM酢酸アンモニウム（pH4.7）中での0.2-0.6M NaClの濃度勾配を用いた陽イオン交換カラム TSK gel CM-SW（トーソー）で分離したところ、主たるRFRP-1様活性は、およそ0.3M NaClで溶出された。RFRP-1

様免疫活性を含むCM-2SWカラムの画分に0.1%となるようTFAを加え、逆相カラム diphenyl 219TP52 (Vydac) でさらに分画した。21-25%アセトニトリルの濃度勾配で分離したところ、RFRP-1様免疫活性は23%アセトニトリルで溶出された。このRFRP-1様免疫活性を含む画分を22-23%アセトニトリルの濃度勾配を用いた逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC2.1/10で最終精製し、RFRP-1様免疫活性と一致する単一のピークを得た(図12)。

### 実施例3 最終精製標品のN末端アミノ酸配列分析およびマスペクトルによる分子量測定

10 実施例2で得られた最終精製標品のN末端アミノ酸をプロテインシーケンサ (model 491cLC; Applied Biosystems) で分析したところ、S-L-T-F-E-E-V-K-D-X-A-P-K-I-K-M-N-K-P-V- (Xは同定できなかったアミノ酸残基を示す) で示されるアミノ酸配列が得られた。

また、ESI-MS (Thermoquest) を用いて、最終精製標品の分子量を測定したところ、  
15 3997.0の値を得た。

これらの分析結果より、ウシ視床下部からの最終精製標品は配列番号：14で表されるアミノ酸配列の第58番目 (Ser) から第92番目 (Phe) の35アミノ酸からなるペプチドであることが判明した。

20 実施例4 配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第56番目 (Ser) ～第92番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドのC末端のカルボキシル基がアミド化されたペプチド(以下hRFRP-1(37)と称する場合がある)の構造遺伝子の調製  
配列番号：59～62に示す4種類のDNA断片(#1：配列番号：15、#4：  
配列番号：18；キコーテック社製) (#2：配列番号：16、#3：配列番号：  
25 17；アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) を用いて、自体公知の方法により、hRFRP-1(37)の構造遺伝子を調製した。

a) DNAオリゴマーのリン酸化

5'末端になるべき#1及び#4を除いた2種類のオリゴマー各1  $\mu$ gを100  $\mu$ Lのリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニット T4ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン) ] 中で37℃、1時間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

b) DNAフラグメントの連結

上記a)で得られたリン酸化DNAフラグメントと#1及び#4各1  $\mu$ gを合わせ10 mM Tris/HCl、2mM EDTA (pH8.0)に加え、120  $\mu$ Lとした。  
この混合液を80℃で10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2 (宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液30  $\mu$ Lにキットに付属のII液30  $\mu$ Lを加え良く混合した後、キットに付属のI液60  $\mu$ Lを加え、37℃、1時間反応させ、ライゲーションを行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

c) 5'末端のリン酸化

沈殿をTE緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) 10  $\mu$ Lに溶解し、100  $\mu$ Lのリン酸化反応液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、0.1mg/mLウシ血清アルブミン、1mM ATP、10ユニット T4ポリヌクレオチドキナーゼ (日本ジーン) ] 中で37℃、1時間反応させ、5'末端のリン酸化を行った。フェノール処理を行った後、水層を回収し2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させ、20  $\mu$ LのTE緩衝液に溶解した。

25 実施例5 hRFRP-1(37)発現プラスミドの調製

発現用ベクターとしてはpTFC (特開2000-270871号公報に記載)をNde IおよびAva I (宝酒造)で37℃ 4時間消化した後、1%ア

- ガロースゲル電気泳動により4.4 kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社)を用いて抽出し、25  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。このpTFCのNde I、Ava I断片と上記により調製したhRFRP-1(37)の構造遺伝子をTaKaRa DNA ligation kit ver.2 (宝酒造)を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を10  $\mu$ l用いて大腸菌JM109コンピテントセル(東洋紡)を形質転換し、10  $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社)を用いてプラスミドpTFCRFRP-1を調製した。このhRFRP-1(37)構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377 DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTFCRFRP-1で大腸菌MM294 (DE3)を形質転換し、RFRP-1-C S 2 3 融合タンパク質発現株大腸菌 (*Escherichia coli*) MM294 (DE3)/pTFCRFRP-1を得た(図13)。
- 15 実施例6 実施例5で得られた形質転換体を、5.0 mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)1Lを用いて、2リットル容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養した。得られた培養液を19リットルの主発酵培地(1.68%リン酸1水素ナトリウム、0.3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第一鉄、0.00025%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸)を仕込んだ50L容発酵槽へ移植して、30℃で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500クレット単位になった時点で、イソプロピルー
- 20  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が12 mg/Lになるように添加し、さらに4時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約500 gの湿菌体を取得し、-80℃で凍結保存した。
- 25

## 実施例 7 hRFRP-1(37)の取得

実施例 6 で得た菌体 500 g に 6 M グアニジン塩酸塩、0.2 M トリス/  
HCL (pH 8.0) 溶液 1000 ml を加え、約 4 時間攪拌した後、遠心分離 (1  
0000 rpm、60 分) を行い、上澄液を 0.6 M アルギニン、1 mM ジチ  
5 オトレイトール、50 mM トリス/HCL (pH 8.0) 29 L で希釈した。一晚  
10℃で静置した後、濃塩酸で pH 6.0 に調整し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した AF-Heparin Toyopearl 650M カラム (11.3 cm ID × 1  
3 cm L、東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、50 mM リン酸緩衝液、2 M  
NaCl、pH 6.0 で溶出を行い、1000 ml の本発明のポリペプチド  
10 (hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質画分) を得た。

この溶出液をペリコンミニカセット (ミリポア社) で 0.1 M 酢酸を加えなが  
ら濃縮を行い、hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質の 0.1 M 酢酸溶液を得  
た。この溶液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、1-シアノ-4-  
ジメチルアミノピリジニウム塩 (DMAP-CN) 445 mg を加えて、室温で 1  
15 5 分間反応した。反応終了後、反応液を 10% 酢酸で平衡化した Sephadex  
x G-25 カラム (46 mm ID × 600 mm L、ファルマシア) に通液し、平衡化に用いた  
10% 酢酸を 6 ml/min の流速で展開し、S-シアノ化された hRFRP-1(37)  
-CS23 融合タンパク質画分を得た。この溶出液をペリコンミニカセット (ミ  
リポア社) で濃縮・脱塩を行い、hRFRP-1(37)-CS23 融合タンパク質の脱塩  
20 液を得た。この脱塩液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、さらに、  
3 M 濃度となるように 25% アンモニア水を加え、15℃で 15 分間反応させた。  
反応終了後、酢酸で pH 6.0 に調整し、hRFRP-1(37) を得た。この反応液を 3  
M 尿素を含む 50 mM MES 緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した SP-5PW (5.  
5 cm ID × 30 cm L、東ソー) に通液し、吸着、洗浄した後、0-50% B (B  
25 = 50 mM MES 緩衝液 + 1 M NaCl + 3 M 尿素) の段階勾配で溶出を行い、  
hRFRP-1(35) を得た (溶出時間: 60 分)。この hRFRP-1(37) 画分を、さらに 0.  
1% トリフルオロ酢酸 (TFA) で平衡化した ODS-120T (21.5 mm ID × 300 mm L、

東ソー)に通液し、吸着、洗浄した後、30-60%B (B:80%アセトニトリル/0.1%TFA)の段階勾配で溶出を行い、hRFRP-1(37)画分をプールした(溶出時間:45分)後、凍結乾燥を行い、hRFRP-1(37)凍結乾燥粉末を得た。

5 実施例8 ヒトOT7T022受容体発現CHO細胞に対する各種RFアミドペプチドのagonist活性の比較

- WO 00/29441号に記載の方法に準じた方法によって得られたヒトOT7T022受容体発現CHO細胞を $3 \times 10^5$  cells/wellの密度で24-wellプレートに播種して一晩培養した。該細胞をハンスバッファー(HBSS)に0.05%のBSAと0.2mMのIBMXを加えた
- 10 バッファーで洗浄した後、同じバッファーで37℃、30分間のプレインキュベーションを行った。次に、ハンスバッファー(HBSS)に0.05%のBSAと0.2mMのIBMXを加えたバッファーあるいはそれに1μMのホルスコリンのみを添加したバッファー、1μMのホルスコリンと様々な濃度のペプチドを添加したバッファーと交換し、37℃、30分間のインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、
- 15 各ウェルの細胞内cAMPの抽出および定量をcAMP EIA Kit(アマシャム社)の方法に従って実施した。各濃度のペプチドについて、ホルスコリン処理による細胞内cAMP量の増加を抑制した割合を算出し、図14に示すような用量-反応曲線を得た。ペプチドのED<sub>50</sub>値はそれぞれ、hRFRP-1-12(配列番号:1の第81番目(Met)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(○))(4.5 nM)、
- 20 hRFRP-1-37(配列番号:1の第56番目(Ser)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(■))(21 nM)、rRFRP-1-37(配列番号:50の第58番目(Ser)ないし第94番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(◇))(30 nM)、hRFRP-2-12(配列番号:1の第101番目(Phe)ないし第112番目(Ser)のアミノ酸配列を有するペプチド(▲))、hRFRP-3-8(配列番号:
- 25 1の第124番目(Val)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸配列を有するペプチド(□))(9.9 nM)、PQRFamide(Pro-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表されるペプチド(◆))(1000 nM以上)、LPLRFamide(Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>で表される

ペプチド (●) (36 nM)、NPFF (Asn-Pro-Phe-Pheで表されるペプチド (△)) (140 nM) であった。

#### 実施例 9 RFRP ペプチドによるヒトOT7T022受容体の活性化に対する百日咳毒素の効果の検討

実施例 8 で取得したヒトOT7T022受容体発現CHO細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well の密度で 24-well プレートに播種して一晩培養した後、100ng/ml の百日咳毒素 (pertussis toxin, SIGMA 社) を添加した培地あるいはコントロールの培地に交換し、さらに一晩培養した。細胞をハンスバッファ (HBSS) に 0.05% の BSA と 0.2mM の IBMX を加えたバッファで洗浄した後、同じバッファで 37℃、30 分間のプレインキュベーションを行った。次に、細胞をハンスバッファ (HBSS) に 0.05% の BSA と 0.2mM の IBMX を加えたバッファのみ (黒色のカラム)、あるいはそれに 1 μM のホルスコリンのみを添加したバッファ (白色のカラム)、1 μM のホルスコリンと 0.1 μM の RFRP-1-12 (配列番号: 1 の第 81 番目 (Met) ないし第 92 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチド) を添加したバッファ (斜線のカラム) と交換し、37℃、30 分間のインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、各ウェルの細胞内 cAMP の抽出および定量を cAMP EIA Kit (アマシヤム社) の方法に従って実施した。その結果、図 15 に示すように百日咳毒素で処理した細胞については RFRP-1-12 による cAMP 産生抑制活性が消失したことから、OT7T022 受容体を介した cAMP 産生抑制反応は百日咳毒素感受性の Gタンパク質 α サブユニットである Gi (抑制性) あるいは Go に共役していることが示された。

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌の促進および抑制作用を有する。即ち、本発明のポリペプチドは、上述の実施例から明らかなように、まずプロラクチン分泌の促進作用を有するため、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。一方、本発明のポリペプチドは、そ



のレセプター蛋白質との親和性が強いため、投与量が増えるとプロラクチン分泌に対し脱感作（desensitization）が起こる結果、プロラクチン分泌を抑制する作用も有する。この場合、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。

- 5 従って、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌促進剤として、卵巢機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

- また、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌、リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。
- 10  
15

本発明のポリペプチドは、とりわけ、高プロラクチン血症、乳汁分泌不全、自己免疫疾患、乳癌の予防および治療薬として有用である。

- その他、本発明のポリペプチドは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、牛、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。
- 20

## 請求の範囲

1. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ  
5 酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくは  
そのエステルまたはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤。
2. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14、配列番号：  
18、配列番号：33 または配列番号：50 で表されるアミノ酸配列である請求  
項1記載の剤。
- 10 3. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ  
酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはその  
アミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤。
4. 配列番号：1 の第81番目 (Met) ないし第92番目 (Phe) のアミノ酸配列  
を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたは  
15 その塩を含有する請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。
5. 配列番号：1 の第101番目 (Ser) ないし第112番目 (Ser) のアミノ酸  
配列を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま  
たはその塩を含有する請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。
6. 配列番号：1 の第124番目 (Val) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸  
20 配列を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま  
たはその塩を含有する請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。
7. 配列番号：1 の第56番目 (Ser) ないし第92番目 (Phe) のアミノ酸配列  
を含有してなる部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたは  
その塩を含有する請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。
- 25 8. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ  
酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドのアミドまた  
はその塩を含有する請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。

9. C末端のカルボキシル基がアミド化されている配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの部分ペプチドまたはその塩を含有する請求項8記載のプロラクチン分泌調節剤。

5. 10. プロラクチン分泌促進剤である請求項1または請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。

11. プロラクチン分泌抑制剤である請求項1または請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。

12. 卵巣機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、  
10 甲状腺機能低下、腎不全の予防または治療薬である請求項10記載のプロラクチン分泌促進剤。

13. 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・  
15 カスティロ (Argonz-del Castillo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌リンパ腫またはシーハン症候群または精子形成異常の予防または治療薬である請求項11記載のプロラクチン分泌抑制剤。

14. 畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤である請求項1または請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。

20 15. プロラクチン分泌機能の検査薬である請求項1または請求項3記載のプロラクチン分泌調節剤。

16. (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸  
25

配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または

- (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

- (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤。

17. (I) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表される

アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

(II) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一

もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエ

5    しくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤。

18. (1) 配列番号：1 の第 8 1 番目 (Met) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(2) 配列番号：1 の第 1 0 1 番目 (Ser) ないし第 1 1 2 番目 (Ser) の
- 10    アミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(3) 配列番号：1 の第 1 2 4 番目 (Val) ないし第 1 3 1 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(4) 配列番号：1 の第 5 6 番目 (Ser) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま
- 15    たはその塩、(5) 配列番号：1 4 の第 8 1 番目 (Met) ないし第 9 2 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(6) 配列番号：1 4 の第 1 0 1 番目 (Ser) ないし第 1 1 2 番目 (Leu) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(7) 配列番号：1 4 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 2 番
- 20    目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(8) 配列番号：3 3 の第 8 3 番目 (Val) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(9) 配列番号：3 3 の第 1 1 8 番目 (Phe) ないし第 1 2 5 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくは
- 25    はそのエステルまたはその塩、(10) 配列番号：3 3 の第 5 8 番目 (Ser) ないし第 9 4 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (11) 配列番号：5 0 の第 5 8 番目

(Ser) ないし第 94 番目 (Phe) のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

19. 請求項 18 記載のペプチドのアミドまたはその塩。

20. C末端のカルボキシル基がアミド化されている請求項 18 記載のペプチド  
5 もしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

21. 請求項 18 記載のペプチドをコードする DNA。

22. (1) 配列番号: 2 の第 241 番目ないし第 276 番目の塩基配列、(2) 配列番号: 2 の第 301 番目ないし第 336 番目の塩基配列、(3) 配列番号: 2 の第 370 番目ないし第 393 番目の塩基配列、(4) 配列番号: 2 の第 16  
10 6 番目ないし第 276 番目の塩基配列、(5) 配列番号: 15 の第 241 番目ないし第 276 番目の塩基配列、(6) 配列番号: 15 の第 301 番目ないし第 336 番目の塩基配列、(7) 配列番号: 15 の第 172 番目ないし第 276 番目のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、(8) 配列番号: 34 の第 247 番目ないし第 282 番目の塩基配  
15 列、(9) 配列番号: 34 の第 352 番目ないし第 375 番目の塩基配列、(10) 配列番号: 34 の第 172 番目ないし第 282 番目の塩基配列、または (11) 配列番号: 51 の第 172 番目ないし第 282 番目の塩基配列を有する請求項 21 記載の DNA。

23. 請求項 18 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。  
20

24. 請求項 21 記載の DNA または請求項 23 記載の抗体を含有してなる診断剤。

25. 請求項 21 記載の DNA に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するアンチセンス DNA。

26. 請求項 18 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる剤。  
25

27. 請求項 18 記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまた

はその塩を含有してなる医薬。

28. プロラクチン分泌調節剤である請求項27記載の医薬。

29. 請求項18記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項18記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

30. さらに配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項29記載のスクリーニング方法。

31. 請求項18記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求項18記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

32. 請求項29記載のスクリーニング方法または請求項31記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる請求項18記載のペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

33. プロラクチン分泌調節作用を有する医薬を製造するための(1)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(2)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の使用。

34. (1)配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(2)配列番号：1で表されるアミ



ノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方法。

35. プロラクチン分泌調節作用を有する医薬を製造するための、

- 5 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、
- 10 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミド
- 15 もしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、
- (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、
- 20 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1
- 25 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の

スクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の使用。

36. プロラクチン分泌調節作用を有する医薬を製造するための、

(I) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および(iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

(II) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴と

するポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有して

5 なる、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルま

10 たはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を

15 含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の使用。

37. (i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミド

20 もしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする

25 ポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそ

のアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

- (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、 (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方法。

38. (I) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または (ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および (iii) 配列番号：37で表されるアミノ酸配列と同一

もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、または、

- 10 (II) (i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、および(iii) 配列番号：37 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミド
- 20 もしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットを用いて得られる、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一
- 25 もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または(ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有

有することを特徴とするポリペプチドの部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とするプロラクチン分泌調節方法。

1/15



1

```

5'   9      18      27      36      45      54
    ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAA CTA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCC ACT TCA AGC
    ---
    Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
    TTG TTA ACA TCA AAC ATT TTT TGT GCA GAT GAA TTA GTG ATG TCC AAT CTT CAC
    ---
    Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser Asn Leu His

      117      126      135      144      153      162
    AGC AAA GAA AAT TAT GAC AAA TAT TCT GAG CCT AGA GGA TAC CCA AAA GGG GAA
    ---
    Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Tyr Pro Lys Gly Glu

      171      180      189      198      207      216
    AGA AGC CTC AAT TTT GAG GAA TTA AAA GAT TGG GGA CCA AAA AAT GTT ATT AAG
    ---
    Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys

      225      234      243      252      261      270
    ATG AGT ACA CCT GCA GTC AAT AAA ATG CCA CAC TCC TTC GCC AAC TTG CCA TTG
    ---
    Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu

      279      288      297      306      315      324
    AGA TTT GGG AGG AAC GTT CAA GAA GAA AGA AGT GCT GGA GCA ACA GCC AAC CTG
    ---
    Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu

      333      342      351      360      369      378
    CCT CTG AGA TCT GGA AGA AAT ATG GAG GTG AGC CTC GTG AGA CGT GTT CCT AAC
    ---
    Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn

      387      396      405      414      423      432
    CTG CCC CAA AGG TTT GGG AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGT GTC TGC AGG ATG CTG
    ---
    Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

      441      450      459      468      477      486
    AGT GAT TTG TGT CAA GGA TCC ATG CAT TCA CCA TGT GCC AAT GAC TTA TTT TAC
    ---
    Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe Tyr

      495      504      513      522      531      540
    TCC ATG ACC TGC CAG CAC CAA GAA ATC CAG AAT CCC GAT CAA AAA CAG TCA AGG
    ---
    Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys Gln Ser Arg

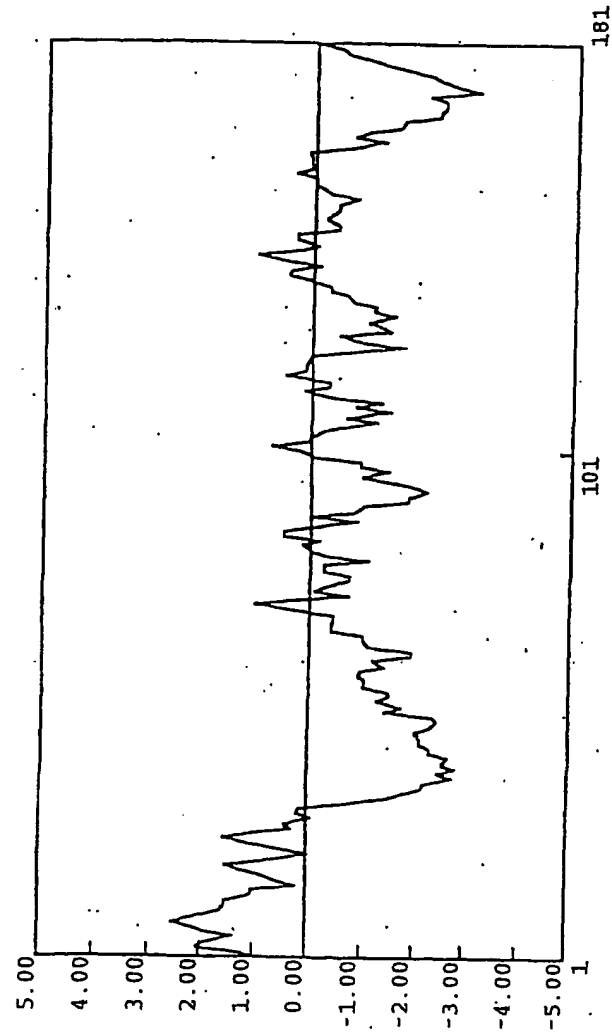
```

TAA 3'

---  
\*\*\*

2/15

図 2





3/15



3

```

5'   9      18      27      36      45      54
   ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAA CTA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCC ACT TCA AGC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
   TTG TTA ACA TCA AAC ATT TTT TGT GCA GAT GAA TTA GTG ATG TCC AAT CTT CAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser Asn Leu His

      117     126     135     144     153     162
   AGC AAA GAA AAT TAT GAC AAA TAT TCT GAG CCT AGA GGA TAC CCA AAA GGG GAA
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Tyr Pro Lys Gly Glu

      171     180     189     198     207     216
   AGA AGC CTC AAT TTT GAG GAA TTA AAA GAT TGG GGA CCA AAA AAT GTT ATT AAG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys

      225     234     243     252     261     270
   ATG AGT ACA CCT GCA GTC AAT AAA ATG CCA CAC TCC TTC GCC AAC TTG CCA TTG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu

      279     288     297     306     315     324
   AGA TTT GGG AGG AAC GTT CAA GAA GAA AGA AGT GCT GGA GCA ACA GCC AAC CTG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu

      333     342     351     360     369     378
   CCT CTG AGA TCT GGA AGA AAT ATG GAG GTG AGC CTC GTG AGA CGT GTT CCT AAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Pro Leu Arg Ser Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn

      387     396     405     414     423     432
   CTG CCC CAA AGG TTT GGG AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGT GTC TGC AGG ATG CTG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

      441     450     459     468     477     486
   AGT GAT TTG TGT CAA GGA TCC ATG CAT TCA CCA TGT GCC AAT GAC TTA TTT TAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe Tyr

      495     504     513     522     531     540
   TCC ATG ACC TGC CAG CAC CAA GAA ATC CAG AAT CCC GAT CAA AAA CAG TCA AGG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys Gln Ser Arg

      549     558     567     576     585
   AGA CTG CTA TTC AAG AAA ATA GAT GAT GCA GAA TTG AAA CAA GAA AAA TAA 3'
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu Lys Gln Glu Lys ***

```

4/15



4

```

5'   9      18      27      36      45      54
    ATG GAA ATT ATT TCA TTA AAA CGA TTC ATT TTA TTG ATG TTA GCC ACT TCA AGC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr Ser Ser

      63      72      81      90      99      108
    TTG TTA ACA TCA AAC ATC TTC TGC ACA GAC GAA TCA AGG ATG CCC AAT CTT TAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met Pro Asn Leu Tyr

      117     126     135     144     153     162
    AGC AAA AAG AAT TAT GAC AAA TAT TCC GAG CCT AGA GGA GAT CTA GGC TGG GAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gly Trp Glu

      171     180     189     198     207     216
    AAA GAA AGA AGT CTT ACT TTT GAA GAA GTA AAA GAT TGG GCT CCA AAA ATT AAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys

      225     234     243     252     261     270
    ATG AAT AAA CCT GTA GTC AAC AAA ATG CCA CCT TCT GCA GCC AAC CTG CCA CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu

      279     288     297     306     315     324
    AGA TTT GGG AGG AAC ATG GAA GAA GAA AGG AGC ACT AGG GCG ATG GCC CAC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Phe Gly Arg Asn Met Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu

      333     342     351     360     369     378
    CCT CTG AGA CTC GGA AAA AAT AGA GAG GAC AGC CTC TCC AGA TGG GTC CCA AAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Pro Leu Arg Leu Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn

      387     396     405     414     423     432
    CTG CCC CAG AGG TTT GGA AGA ACA ACA ACA GCC AAA AGC ATT ACC AAG ACC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu

      441     450     459     468     477     486
    AGT AAT TTG CTC CAG CAG TCC ATG CAT TCA CCA TCT ACC AAT GGG CTA CTC TAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu Leu Tyr

      495     504     513     522     531     540
    TCC ATG GCC TGC CAG CCC CAA GAA ATC CAG AAT CCT GGT CAA AAG AAC CTA AGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln Lys Asn Leu Arg

      549     558     567     576     585
    AGA CGG GGA TTC CAG AAA ATA GAT GAT GCA GAA TTG AAA CAA GAA AAA TAA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
    Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu Lys Gln Glu Lys ***

```

5/15



5

5'                    9                    18                    27                    36                    45                    54  
 ATG GAA ATT ATT TCA TCA AAG CGA TTC ATT TTA TTG ACT TTA GCA ACT TCA AGC  
 Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser Ser  
                   63                    72                    81                    90                    99                    108  
 TTC TTA ACT TCA AAC ACC CTT TGT TCA GAT GAA TTA ATG ATG CCC CAT TTT CAC  
 Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met Pro His Phe His  
                   117                    126                    135                    144                    153                    162  
 AGC AAA GAA GGT TAT GGA AAA TAT TAC CAG GTG AGA GGA ATC CCA AAA GGG GTA  
 Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Gly Ile Pro Lys Gly Val  
                   171                    180                    189                    198                    207                    216  
 AAG GAA AGA AGT GTG ACT TTT CAA GAA CTC AAA GAT TGG GGG GCA AAG AAA GAT  
 Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp  
                   225                    234                    243                    252                    261                    270  
 ATT AAG ATG AGT CCA GCC CCT GCC AAC AAA GTG CCC CAC TCA GCA GCC AAC CTT  
 Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu  
                   279                    288                    297                    306                    315                    324  
 CCC CTG AGG TTT GGG AGG AAC ATA GAA GAC AGA AGA AGC CCC AGG GCA CGG GCC  
 Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala  
                   333                    342                    351                    360                    369                    378  
 AAC ATG GAG GCA GGG ACC ATG AGC CAT TTT CCC AGC CTG CCC CAA AGG TTT GGG  
 Asn Met Glu Ala Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly  
                   387                    396                    405                    414                    423                    432  
 AGA ACA ACA GCC AGA CGC ATC ACC AAG ACA CTG GCT GGT TTG CCC CAG AAA TCC  
 Arg Thr Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
                   441                    450                    459                    468                    477                    486  
 CTG CAC TCC CTG GCC TCC AGT GAA TCG CTC TAT GCC ATG ACC CGC CAG CAT CAA  
 Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln His Gln  
                   495                    504                    513                    522                    531                    540  
 GAA ATT CAG AGT CCT GGT CAA GAC CAA CCT AGG AAA CGC GTG TTC ACG GAA ACA  
 Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val Phe Thr Glu Thr  
                   549                    558                    567                    576                    585                    594  
 GAT GAT GCA GAA AGG AAA CAA GAA AAA ATA GGA AAC CTC CAG CCA GTC CTT CAA  
 Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn Leu Gln Pro Val Leu Gln  
                   603                    612  
 GGG GCT ATG AAG CTG TGA    3'  
 Gly Ala Met Lys Leu \*\*\*

差替え用紙(規則26)

6/15

ⓧ

6

hLPLRF.aa	1	MELISSKRFI	10	20	30	40	50	50
bLPLRF.aa	1	MELISSKRFI	10	20	30	40	50	50
rLPLRF.aa	1	MELISSKRFI	10	20	30	40	50	50
hLPLRF.aa	51	--YPKG--	60	70	80	90	100	100
bLPLRF.aa	51	LGWEK---	60	70	80	90	100	100
rLPLRF.aa	51	---PKGVKER	60	70	80	90	100	100
hLPLRF.aa	101	VOEERSACAT	110	120	130	140	150	150
bLPLRF.aa	101	MEEERSIRAM	110	120	130	140	150	150
rLPLRF.aa	101	IEDRRSFRAR	110	120	130	140	150	150
hLPLRF.aa	151	DLQGSMSHSP	160	170	180	190	200	200
bLPLRF.aa	151	NLLQGSMSHSP	160	170	180	190	200	200
rLPLRF.aa	151	GLPQKSHSL	160	170	180	190	200	200
hLPLRF.aa	201	K*	210	220	230	240	250	250
bLPLRF.aa	201	K*	210	220	230	240	250	250
rLPLRF.aa	201	KIGNLPVLQ	210	220	230	240	250	250

7/15



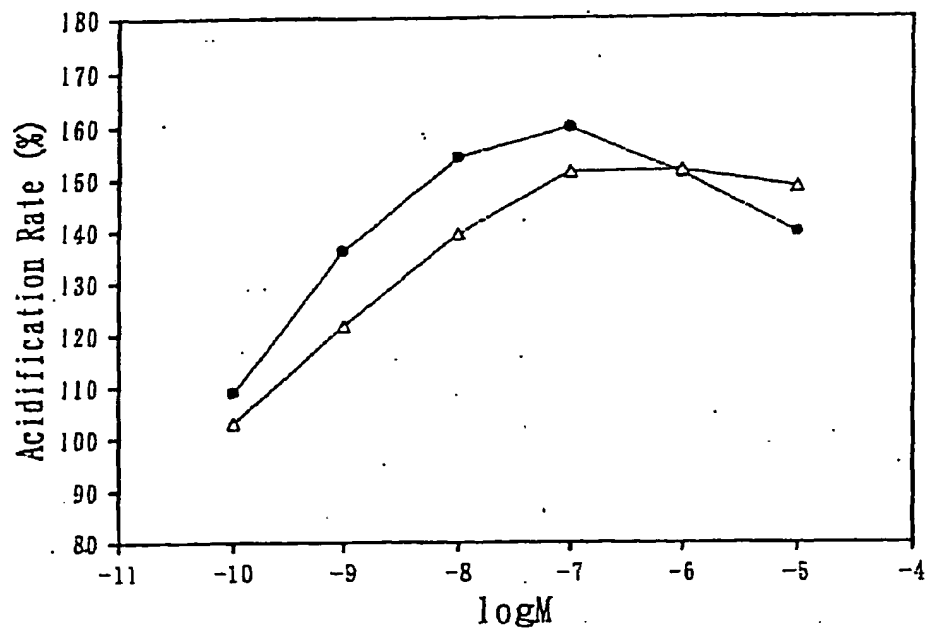
1	TTTAGACTTAGACGAAATGGAAATTATTTTCATTAACGATTCAATTTTATTGACTGTG	58
1	MetGluIleIleSerLeuLysArgPheIleLeuLeuThrVal	14
59	GCAACTTCAAGCTTCTTAACATCAAACACCTTCTGTACAGATGAGTTCATGATGCCTCAT	118
15	AlaThrSerSerPheLeuThrSerAsnThrPheCysThrAspGluPheMetMetProHis	34
119	TTTCACAGCAAAGAAGGTGACGGAAAATACTCCAGCTGAGAGGAATCCCAAAGGGGAA	178
35	PheHisSerLysGluGlyAspGlyLysTyrSerGlnLeuArgGlyIleProLysGlyGlu	54
179	AAGGAAAGAAGTGTCAAGTTTCAAGAACTAAAAGATTGGGGGGCAAAGAATGTTATTAAG	238
55	LysGluArgSerValSerPheGlnGluLeuLysAspTrpGlyAlaLysAsnValIleLys	74
239	ATGAGTCCAGCCCCTGCCAACAAAGTGCCCCACTCAGCAGCCAACCTGCCCTGAGATTT	298
75	MetSerProAlaProAlaAsnLysValProHisSerAlaAlaAsnLeuProLeuArgPhe	94
299	GGAAGGACCATAGATGAGAAAAGAAGCCCCGAGCACGGGTCAACATGGAGGCAGGGACC	358
95	GlyArgThrIleAspGluLysArgSerProAlaAlaArgValAsnMetGluAlaGlyThr	114
359	AGGAGCCATTTCCCGAGCTGCCCAAAGGTTTGGGAGAACAACAGCCAGAAGCCCCAAG	418
115	ArgSerHisPheProSerLeuProGlnArgPheGlyArgThrThrAlaArgSerProLys	154
419	ACACCCGCTGATTGCCACAGAAACCCCTGCACTCACTGGGCTCCAGCGAGTTGCTCTAC	538
135	ThrProAlaAspLeuProGlnLysProLeuHisSerLeuGlySerSerGluLeuLeuTyr	154
479	GTCATGATCTGCCAGCACCAAGAAATTCAGAGTCCTGGTGAAAGCGAACGAGGAGAGGA	538
155	ValMetIleCysGlnHisGlnGluIleGlnSerProGlyGlyLysArgThrArgArgGly	174
539	GCGTTTGTGGAACAGATGATGCAGAAAGGGAAACCAGAAAAATAGGAAACTCGAGCCCCG	598
175	AlaPheValGluThrAspAspAlaGluArgLysProGluLys***	188
599	ACTTCAAGAGGCTACGGAGC	618
188		188

差替え用紙(規則26)

8/15



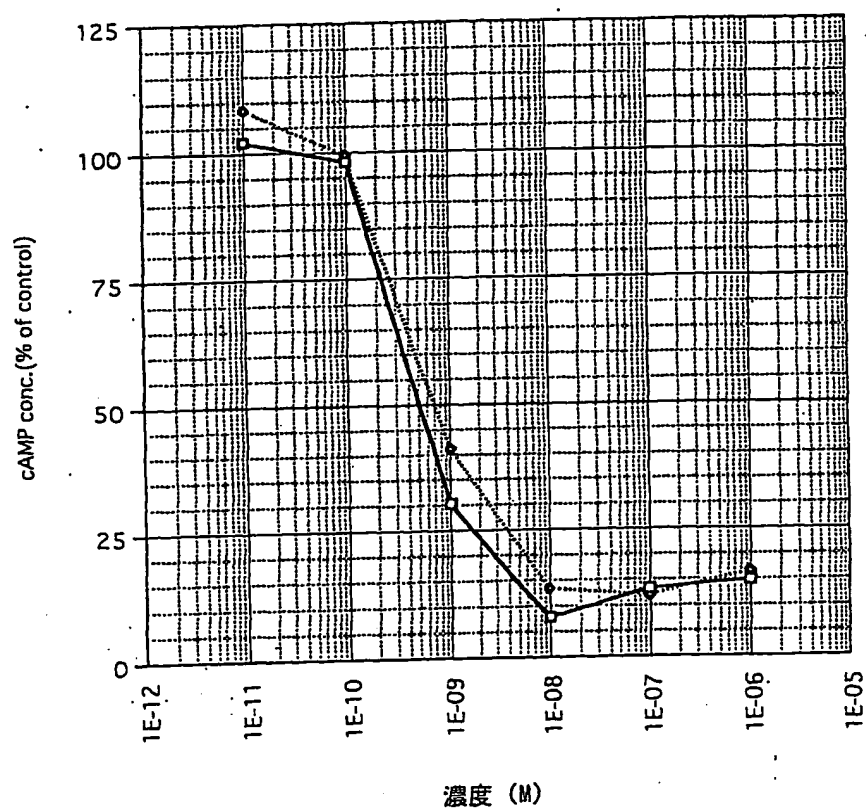
8



9/15

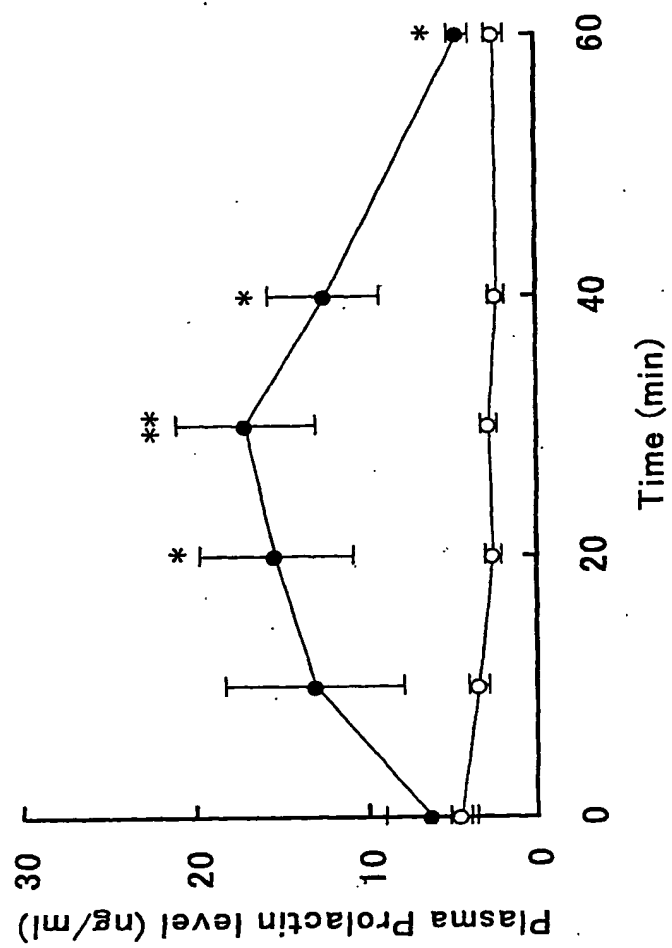


9



10/15

☒ 10

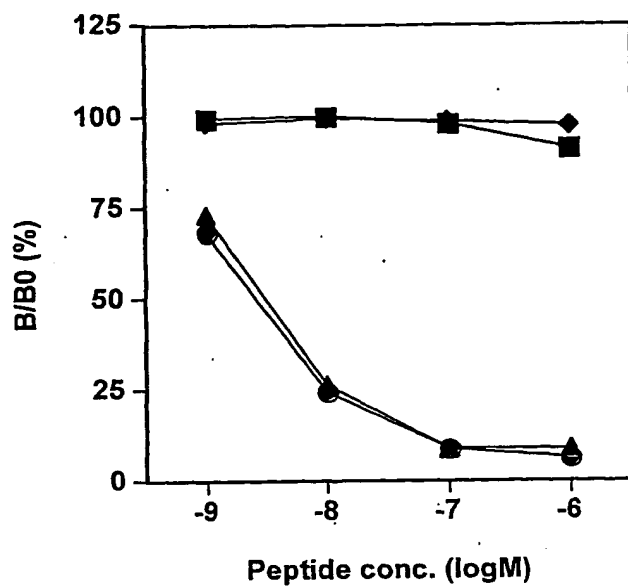




11/15

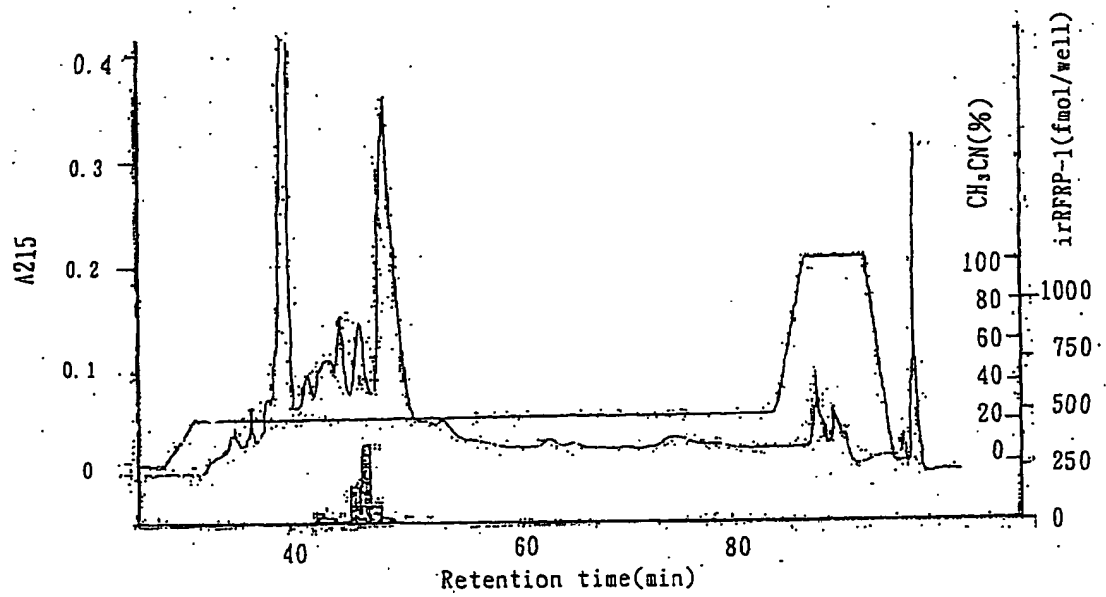


1 1



12/15

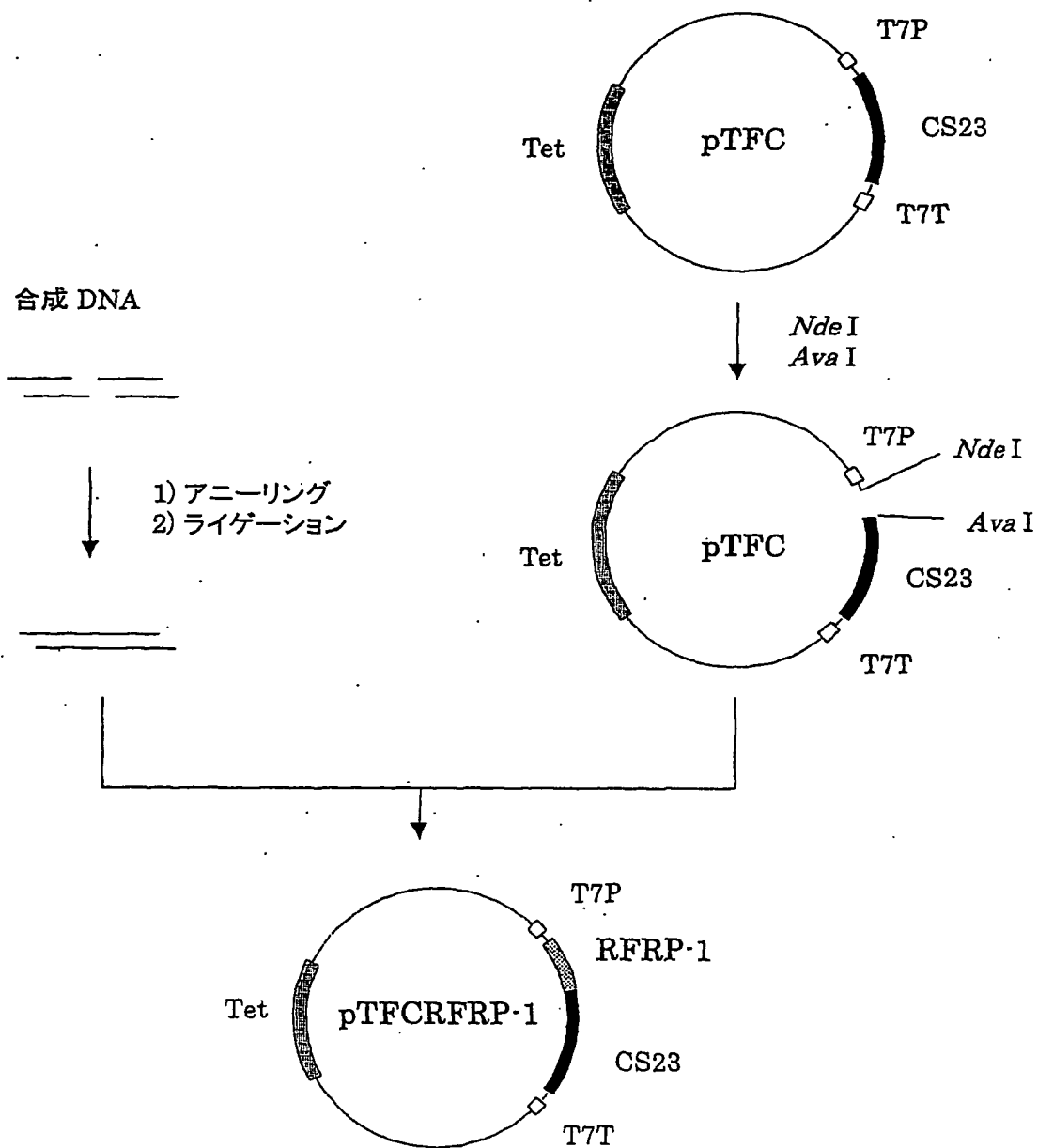
☒ 1.2



差替え用紙(規則26)

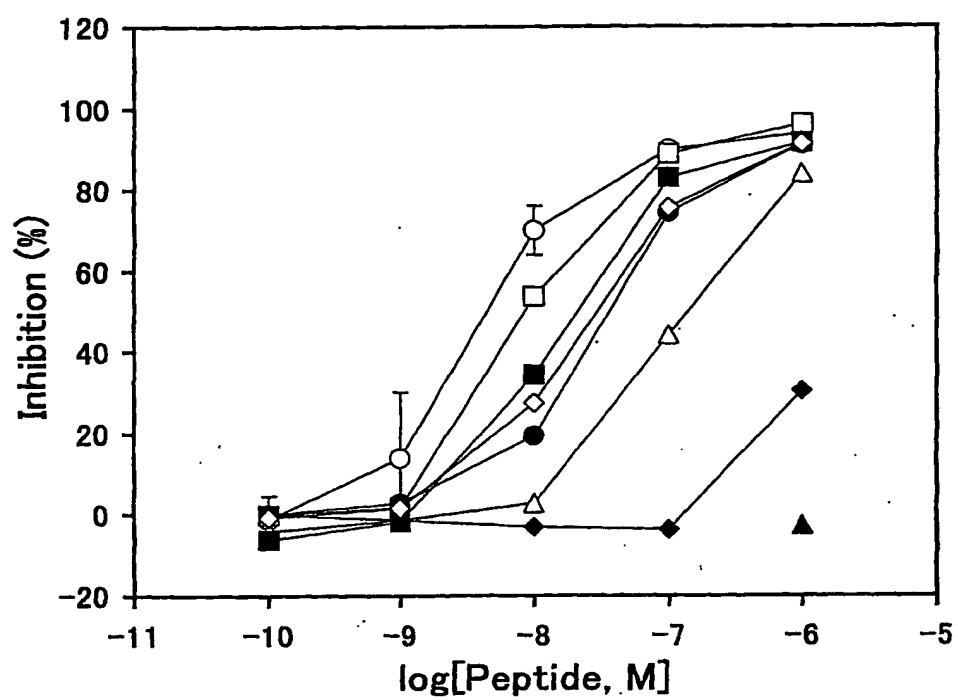
13/15

☒ 1 3



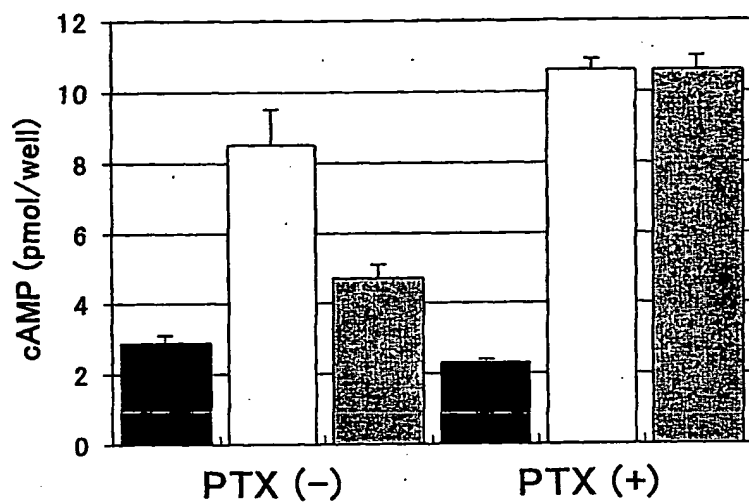
14/15

☒ 1 4



15/15

☒ 1 5



1/33

## [Sequence Listing]

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Prolactin secretion modulator containing RFRP

&lt;130&gt; 2697W00P

&lt;150&gt; JP 12-065752

&lt;151&gt; 2000-03-06

&lt;150&gt; JP 12-378001

&lt;151&gt; 2000-12-07

&lt;160&gt; 62

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 180

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr
1				5					10					15	
Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Phe	Cys	Ala	Asp	Glu	Leu	Val	Met
			20					25					30		
Ser	Asn	Leu	His	Ser	Lys	Glu	Asn	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg
		35					40					45			
Gly	Tyr	Pro	Lys	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Asn	Phe	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp
	50					55					60				
Trp	Gly	Pro	Lys	Asn	Val	Ile	Lys	Met	Ser	Thr	Pro	Ala	Val	Asn	Lys
65				70					75				80		
Met	Pro	His	Ser	Phe	Ala	Asn	Leu	Pro	Leu	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Val
				85					90				95		

2/33

Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser

100

105

110

Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro

115

120

125

Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

130

135

140

Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu

145

150

155

160

Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln

165

170

175

Lys Gln Ser Arg

180

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 540

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```

atggaaatta ttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgita 60
acatcaaaca ttttttgigc agatgaatta gtagatgicca atcttcacag caaagaaaaf 120
tatgacaaat attctgagcc tagaggatac caaaaggagg aaagaagcct caattttgag 180
gaattaaaag attggggacc aaaaaatggt attaagaatga gtacacctgc agtcaataaa 240
atgccacact ccttcgccaa ctgcccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300
agtgtctggag caacagccaa cctgcctctg agatctgga agaaatatgga ggtgagcctc 360
gtgagacgtg ttccctaacct gcccctaaagg ttggggagaa caacaacagc caaagtgic 420
tgcaggatgc tgagtgatit gtgtcaagga tccatgcatt caccatgtgc caatgactta 480
ttttactcca tgacctgccg gcaccaagaa atccagaatc ccgatcaaaa acagicaagg 540

```

3/33

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

gggctgcaca tagagacita attttag

27

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

ctagaccacc tctatataac tgcccat

27

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

gcacatagag acttaatttt agatttagac

30

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 27



4/33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 6

catgcacttt gactgggtttc caggtaa

27

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 7

cagctttagg gacaggctcc aggtttc

27

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 8

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1

5

10

15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met

20

25

30

Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35

40

45

Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp

5/33

50                      55                      60  
 Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val  
                     85                      90                      95  
 Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser  
                     100                      105                      110  
 Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro  
                     115                      120                      125  
 Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu  
                     130                      135                      140  
 Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln  
                     165                      170                      175  
 Lys Gln Ser Arg Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu  
                     180                      185                      190  
 Lys Gln Glu Lys  
                     195

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 9

atggaaatta tticacaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgita 60  
 acatcaaaca tttttgtgc agatgaatta gtagatgccca atcttcacag caaagaaaaat 120

6/33

tatgacaaat attctgagcc tagaggatac ccaaaagggg aaagaagcct caattttgag 180  
 gaattaaaag attggggacc aaaaaatggt attaagaatga gtacaccigc agtcaataaa 240  
 atgccacact ccttcgccaa cttgccatig agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300  
 agtgcigggag caacagccaa cctgcctcig agatciggaa gaaataatga ggtgagcctc 360  
 gtgagacgtg ttcctaacct gcccacaagg ttigggagaa caacaacagc caaaagtgic 420  
 tgcaggatgc tgagtgattt gtgtcaagga tccatgcatt caccaigtgc caatgactta 480  
 ttttaticca tgacctgcca gcaccaagaa atccagaatc ccgatcaaaa acagtcaagg 540  
 agactgctat tcaagaaaat agatgatgca gaatigaaac aagaaaaa 588

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 10

gcctagagga gatctaggct gggagga

27

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

gggaggaaca tggaagaaga aaggagc

27

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 27

7/33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 12

gatggigaat gcatggactg ctggagc

27

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

ttccctcccaa atctcagtgg caggitg

27

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 14

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr

1

5

10

15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met

20

25

30

Pro Asn Leu Tyr Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35

40

45

Gly Asp Leu Gly Trp Glu Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val

8/33

50                      55                      60  
 Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Met  
                     85                      90                      95  
 Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu Pro Leu Arg Leu  
                     100                      105                      110  
 Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn Leu Pro  
                     115                      120                      125  
 Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu  
                     130                      135                      140  
 Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Tyr Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln  
                     165                      170                      175  
 Lys Asn Leu Arg Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu  
                     180                      185                      190  
 Lys Gln Glu Lys

195

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 15

atggaaatta tticattaaa acgattcatt ttattgatgt tagccacttc aagcttgtta 60

acatcaaaca tcttctgcac agacgaatca aggatgccca atctttacag caaaaagaat 120

9/33

tatgacaaat attccgagcc tagaggagat ctaggctggg agaaagaaag aagtcctact 180  
ttigaagaag taaaagattg ggctccaaaa attaagatga ataaacctgt agtcaacaaa 240  
atgccaccit ctgcagccaa cctgccctcg agatttggga ggaacatgga agaagaaagg 300  
agcactaggg cgatggccca cctgccctcg agactcggaa aaaatagaga ggacagcctc 360  
tccagatggg tcccaaatct gcccagagg ttiggaagaa caacaacagc caaaagcatt 420  
accaagaccc tgagtattt gctccagcag tccaigcatt caccaictac caatgggcta 480  
ctctactcca tggcctgcca gcccagaa atccagaatc ctggtaaaaa gaacctagg 540  
agacggggat tccagaaaat agatgatgca gaattgaaac aagaaaaa 588

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 16

ccctggggct tcttctgct tctatgt

27

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 17

agcgattcat tttattgact itagca

26

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 203

10/33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 18

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85 90 95

Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala

100 105 110

Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr

115 120 125

Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser

130 135 140

Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln

145 150 155 160

His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val

165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn

11/33

180

185

190

Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu

195

200

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 19

```

atggaaattt tttcatcaaa gcgattcatt ttattgacit tagcaacttc aagcttctta 60
acttcaaaca cccittgttc agatgaatta atgatgcccc attttcacag caaagaaggt 120
tatggaaaat attaccagct gagaggaatc caaaaggagg taaaggaaag aagigtact 180
tttcaagaac tcaaagattg gggggcaaag aaagatatia agatgagtc agcccttgcc 240
aacaagatgc cccactcagc agccaacctt cccctgaggt ttgggaggaa catagaagac 300
agaagaagcc ccagggcacg ggccaacatg gaggcaggga ccatgagcca ttttcccagc 360
ctgccccaaa ggittgggag aacaacagcc agacgcatca ccaagacact ggciggtttg 420
ccccagaaat ccttgcactc cctggcctcc agtgaatcgc tctatgccat gaccgcccag 480
catcaagaaa ttcagagtc tggtaagag caacctagga aacgggigt ttcaggaaaca 540
gatgatgcag aaaggaaaca agaaaaata ggaaaccttc agccagtcct tcaaggggct 600
atgaagctg
609

```

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 20



12/33

mgnttyggna ar

12

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 21

mgnttyggnm gn

12

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 22

mgnwsnggna ar

12

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 23

mgnwsnggnm gn

12

&lt;210&gt; 24

13/33

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 24

mgnytinggna ar

12

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 25

mgnytinggnm gn

12

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 26

gacttaattt tagattitaga caaaaigggaa

30

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

14/33

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 27

ttctcccaaa cctttggggc aggtt

25

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 28

acagcaaaga aggtgacgga aaatactc

28

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 29

atagatgaga aaagaagccc cgcagcac

28

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

15/33

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 30

gtgctgcggg gcttcctttc tcacttat

28

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 31

tttagactta gacgaaatgg a

21

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 32

gtcccgtagc ctcttgaagt c

21

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 33

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Val Ala Thr

1

5

10

15

16/33

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Phe Cys Thr Asp Glu Phe Met Met

20

25

30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Asp Gly Lys Tyr Ser Gln Leu Arg

35

40

45

Gly Ile Pro Lys Gly Glu Lys Glu Arg Ser Val Ser Phe Gln Glu Leu

50

55

60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65

70

75

80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85

90

95

Thr Ile Asp Glu Lys Arg Ser Pro Ala Ala Arg Val Asn Met Glu Ala

100

105

110

Gly Thr Arg Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr

115

120

125

Thr Ala Arg Ser Pro Lys Thr Pro Ala Asp Leu Pro Gln Lys Pro Leu

130

135

140

His Ser Leu Gly Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Val Met Ile Cys Gln His

145

150

155

160

Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gly Lys Arg Thr Arg Arg Gly Ala Phe

165

170

175

Val Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Pro Glu Lys

180

185

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 564

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

17/33

&lt;400&gt; 34

atggaaaatta tticattaaa acgattcatt ttattgacig tggcaacttc aagcttctta 60  
acatcaaaca ctttctgtac agatgagtic atgatgccic attttcacag caaagaaggt 120  
gacggaaaat actcccagct gagaggaaic caaaagggg aaaaggaaag aagtgtcagt 180  
tttcaagaac taaaagatig gggggcaaag aatgttatta agatgagtic agccccigcc 240  
aaciaaagtc ccactcagc agccaacctg cccctgagat ttggaaggac catagatgag 300  
aaaagaagcc ccgcagcacg ggtcaacaig gaggcaggga ccaggagcca ttccccagc 360  
ctgccccaaa ggtttgggag aacaacagcc agaagcccca agacaccgc tgatttgcca 420  
cagaaacccc tgcactcact gggctccagc gattgtctc acgtcatgat ctgccagcac 480  
caagaaattc agagtcctgg tggaaagcga acgaggagag gagcgttgtt ggaacagat 540  
gatgcagaaa ggaaaccaga aaaa 564

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 35

agtcgacagt atggaggcgg agccctc 27

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 36

18/33

gactagtcca aatgticcag gccgggatg

29

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 432

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 37

Met Glu Ala Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Gly Ser Trp Pro Leu Gly

5

10

15

Gln Asn Gly Ser Asp Val Glu Thr Ser Met Ala Thr Ser Leu Thr Phe

20

25

30

Ser Ser Tyr Tyr Gln His Ser Ser Pro Val Ala Ala Met Phe Ile Ala

35

40

45

Ala Tyr Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr Leu Val

50

55

60

Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met Arg Thr Val Thr Asn Met

65

70

75

80

Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile Phe Cys

85

90

95

Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro Phe Asp

100

105

110

Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser Val Ser

115

120

125

Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe Arg Cys

130

135

140

Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala Leu Phe

145

150

155

160

19/33

Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys Pro Ser  
 165 170 175  
 Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met Leu Asp  
 180 185 190  
 Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala Trp Pro  
 195 200 205  
 Glu Lys Gly Met Arg Lys Val Tyr Thr Ala Val Leu Phe Ala His Ile  
 210 215 220  
 Tyr Leu Val Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Val Arg Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Arg Asp Thr Glu Glu Ala  
 245 250 255  
 Val Ala Glu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His  
 260 265 270  
 Met Leu Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu  
 275 280 285  
 Trp Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Glu Leu Ser Glu Leu Gln  
 290 295 300  
 Leu His Leu Leu Ser Val Tyr Ala Phe Pro Leu Ala His Trp Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Phe Phe His Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu  
 325 330 335  
 Asn Phe Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Gln Leu Cys Trp  
 340 345 350  
 Pro Pro Trp Ala Ala His Lys Gln Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Asn Arg  
 355 360 365



20/33

Leu Leu Arg Arg Arg Val Val Val Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly

370

375

380

Leu Pro Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Val Pro Gly Pro Gly Arg

385

390

395

400

Leu Pro Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His Gln Asp Gly Pro Gly Glu

405

410

415

Gly Pro Gly Cys Asn His Met Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asn Ile

420

425

430

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 38

atggaggcgg agccctccca gccctcccaac ggcagctggc ccttgggtca gaacgggagt 60  
gatgiggaga ccagcatggc aaccagcctc accttctctt cctactacca acattctctt 120  
ccggitggcag ccatgttcat cgcggcctac gtgtctcatct tcttctcttg catggtgggc 180  
aacaccctgg tctgttcat tigtctcaag aaccggcaca tgcgcactgt caccaacatg 240  
tttatcttca acctggccgt cagcgacctg ctgggtggga tcttctgcat gccacaacc 300  
cttigggaca accttatcac tggttggcct ttgacaacg ccacatgcaa gatgagcggc 360  
ttggitgcagg gcatgtccgt gtctgcatcg gtttcacac tggttggccat cgctgtggaa 420  
aggttccgct gcatctgca cccittccgc gagaagctga cccitcgaa ggcgtgttc 480  
accatcgagg tgaatgggc tctggcgctg ctcatcatgt gtccctcggc ggtcactctg 540  
acagtcaccc gagaggagca tcattcatg ctggatgctc glaaccgctc ctaccgctc 600  
tactctgtgt gggaggcctg gcccgagaag ggcattcgca aggtctacac cgcggtgctc 660  
ttcgcgcaca tctacctggt gccgtggcg ctcatcgtag tgaatgacgt gcgcatcgcg 720  
cgcaagctat gccaggcccc cgttcttgcg cgcgacacgg aggaggcggg ggccgagggt 780

21/33

ggccgcacit cgcccgtag gggccgcgtg gtgcacatgc tggatcatgt ggcgctcttc 840  
 ttacagttgt cctggctgcc actctgggtg ctgctgctgc tcatcgacta tggggagctg 900  
 agcgagctgc aactgcacct gcgtcggc tacgccctcc ccttggcaca ctggctggcc 960  
 ttcttccaca gcagcgccaa ccccatcatc tacggctact tcaacgagaa ctccgccgc 1020  
 ggcttccagg ctgccttccg tgcacagctc tgcctggcctc cctggggccgc ccacaagcaa 1080  
 gcctactcgg agcgggccaa ccgcttctg cgcaggcggg tgggtgtgga cgtgcaacc 1140  
 agcgactccg gcctgccatc agagtcggc cccagcagcg ggggtcccagg gcctggccgg 1200  
 ctgccactgc gcaatggcg tgtggcccat caggatggcc cgggggaagg gccaggctgc 1260  
 aaccacaigc cctcaccat cccggccig aacattiga 1299

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

&lt;400&gt; 39

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe

1

5

10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

&lt;400&gt; 40

Val Pro Asn Leu Pro Gln Arg Phe

22/33

1 5

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH<sub>2</sub>) form

&lt;400&gt; 41

Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Arg Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 42

atgccacact ccttcgcca cttgccatig agatit

36

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 43

agtgtggag caacagccaa cctgcctctg agatct

36

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

23/33

&lt;400&gt; 44

gttcctaacc tgccccaag gttt

24

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 45

atggaaatta ttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgita 60

acatcaaaca tttttigtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaat 120

tatgacaaat attctgagcc tagaggatac caaaaggagg aaagaagcct caattitgag 180

gaattaaaag attggggacc aaaaaatggtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240

atgccacact ccttcgcca cttgccattg agattt 276

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 46

atggaaatta ttcatcaaa actattcatt ttattgactt tagccacttc aagcttgita 60

acatcaaaca tttttigtgc agatgaatta gtgatgtcca atcttcacag caaagaaaat 120

tatgacaaat attctgagcc tagaggatac caaaaggagg aaagaagcct caattitgag 180

gaattaaaag attggggacc aaaaaatggtt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240

atgccacact ccttcgcca cttgccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300

agtgtgtggag caacagccaa cctgcctctg agatct 336

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

24/33

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 47

aiggaatta ttcatcaaa actatcatt ttatigacti tagccacttc aagcttgita 60  
acatcaaaca tttttigigc agatgaatta gtaggtcca atcttcacag caaagaaaat 120  
taigacaaat attctgagcc tagaggatac ccaaaagggg aaagaagcct caattttgag 180  
gaattaaaag attggggacc aaaaaatggt attaagatga gtacacctgc agtcaataaa 240  
atgccacact ccttcgcaa ctgccattg agatttggga ggaacgttca agaagaaaga 300  
agtgciggag caacagccaa cctgcctctg agatcigga agaaatatgga ggtgagcctc 360  
gtgagacgtg ttcctaacct gcccacaaagg ttt 393

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 48

ccctggggct tcttctgtct tctatgt 27

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 49

agcgattcat ttatigact ttagca 26

&lt;210&gt; 50

25/33

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 50

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met  
 20 25 30  
 Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg  
 35 40 45  
 Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg  
 85 90 95  
 Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
 115 120 125  
 Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
 130 135 140  
 Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln  
 145 150 155 160  
 His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val  
 165 170 175

26/33

Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn

180

185

190

Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu

195

200

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 51

```

atggaaatta ttatcatcaa gcgattcatt ttatigactt tagcaacttc aagcttctta   60
acttcaaaca ccccttggtc agatgaattt atgatgcccc attttcacag caaagaaggt   120
tatggaaaat attaccagct gagaggaatc caaaaggagg taaaggaaag aagtgtcact   180
tttcaagaac tcaaagattg gggggcaaag aaagatatia agatgagtc agcccttgcc   240
aacaagatgc cccacacagc agccaacctt cccctgaggt ttgggaggaa catagaagac   300
agaagaagcc ccagggcacg ggccaacatg gaggcaggga ccatgagcca ttttccagc   360
ctgccccaaa ggtttgggag aacaacagcc agacgcattc ccaagacact ggctgggttg   420
cccagaaat cctgcacatc cctggcctcc agtgaattgc tctatgccat gacccgccag   480
catcaagaaa ttcagagtc tggtaagag caacctagga aacgggtgtt cacggaaaca   540
gatgatgcag aaaggaaaca agaaaaata ggaaacctcc agccagtcct tcaaggggt   600
atgaagctg                                     609

```

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

27/33

&lt;400&gt; 52

ttctagattt tggacaaaat ggaaatt

27

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 53

cgtctttagg gacaggctcc agatttc

27

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 430

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 54

Met Glu Gly Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Ser Ser Trp Pro Leu Ser

1

5

10

15

Gln Asn Gly Thr Asn Thr Glu Ala Thr Pro Ala Thr Asn Leu Thr Phe

20

25

30

Ser Ser Tyr Tyr Gln His Thr Ser Pro Val Ala Ala Met Phe Ile Val

35

40

45

Ala Tyr Ala Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr Leu Val

50

55

60

Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met His Thr Val Thr Asn Met

65

70

75

80

Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile Phe Cys



28/33

85

90

95

Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro Phe Asp

100

105

110

Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser Val Ser

115

120

125

Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe Arg Cys

130

135

140

Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala Leu Val

145

150

155

160

Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys Pro Ser

165

170

175

Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met Val Asp

180

185

190

Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala Trp Pro

195

200

205

Glu Lys Gly Met Arg Arg Val Tyr Thr Thr Val Leu Phe Ser His Ile

210

215

220

Tyr Leu Ala Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Ala Arg Ile Ala

225

230

235

240

Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Pro Gly Gly Glu Glu Ala

245

250

255

Ala Asp Pro Arg Ala Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Val His Met Leu

260

265

270

Val Met Val Ala Leu Phe Phe Thr Leu Ser Trp Leu Pro Leu Trp Ala

275

280

285

Leu Leu Leu Leu Ile Asp Tyr Gly Gln Leu Ser Ala Pro Gln Leu His

29/33

290                      295                      300  
 Leu Val Thr Val Tyr Ala Phe Pro Phe Ala His Trp Leu Ala Phe Phe  
 305                      310                      315                      320  
 Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Tyr Phe Asn Glu Asn Phe  
                          325                      330                      335  
 Arg Arg Gly Phe Gln Ala Ala Phe Arg Ala Arg Leu Cys Pro Arg Pro  
                          340                      345                      350  
 Ser Gly Ser His Lys Glu Ala Tyr Ser Glu Arg Pro Gly Gly Leu Leu  
                          355                      360                      365  
 His Arg Arg Val Phe Val Val Val Arg Pro Ser Asp Ser Gly Leu Pro  
                          370                      375                      380  
 Ser Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Arg Pro Gly Arg Leu Pro  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Arg Asn Gly Arg Val Ala His His Gly Leu Pro Arg Glu Gly Pro  
                          405                      410                      415  
 Gly Cys Ser His Leu Pro Leu Thr Ile Pro Ala Trp Asp Ile  
                          420                      425                      430

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 1290

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 55

atggaggggg agccctccca gccctccaac agcagtiggc ccctaagtica gaatgggact 60  
 aacacigagg ccaccccggc tacaacctc accttctcct cctactatca gcacacctcc 120  
 cctgtggcgg ccatgttcat tgggcctat gcgctcatct tctgtctctg catgggtggc 180  
 aacaccctgg tctgtttcat cgigtcaag aaccggcaca tgcatactgt caccaacatg 240

30/33

ttcatccica acctggctgt cagtgacctg ctggaggga tcttctgcat gcccaccacc 300  
 ctltgggaca acctcatcac tgggtggccc ttcgacaatg ccacatgcaa gatgagcggc 360  
 ttgggtcagg gcatgtctgt gtctggcttcc gttttcacac tggtaggcat tgcgttgga 420  
 aggttccgt gcatcgtgca cctttccgc gagaagctga ccttgcggaa ggcgtctgtc 480  
 accatcgccg tcatcgggc cctggcgtg ctcatcatgt gtccctcggc cgtcacgtg 540  
 accgtacccc gtgaggagca ccacttcatg gtggagcccc gcaaccgtc ctaccctctc 600  
 tactcctgt gggaggccgt gcccgagaag ggcatgcga gggcttacac cactgtgtc 660  
 ttctgcaca tctaccggc gccgtggcg ctcatcgtg tcatgtacgc ccgcatcgcg 720  
 cgcaagctct gccaggcccc gggcccgcc cccggggcg aggaggctgc ggaccgcga 780  
 gcatcgcg gcagagcgc cgtgggtcac atgtcgtgca tggtagcgct gtcttcacg 840  
 ctgtcctggc tgcgcctgt ggcgtgtgt ctgtcatcg actacggga gtcagcgcg 900  
 ccgcagctgc acctggcac cgtctacgc tttcccttcg cgcaciggt ggcttcttc 960  
 aacagcagcg ccaaccccat catctacgc tacttcaac agaacttccg ccgcggttc 1020  
 caggccgct tccgcgccc cctctgccc gcccgtcgg ggagccaca ggaggcctac 1080  
 tccgagcggc ccggcgggt tctgcacagg cgggtcttc tgggtgtcg gccagcgac 1140  
 tccggcgtgc cctctgagtc gggccctagc agtggggccc ccaggcccgg ccgctcccg 1200  
 ctgcggaatg ggcgggtggc tcaccacggc ttgccaggg aaggccctgg ctgtccac 1260  
 ctgcccica ccattccagc ctgggatatc 1290

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 1290

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 56

atggagggg agccctccca gcctcccaac agcagttggc ccctaagta gaatgggact 60  
 aacactgagg ccacccggc tacaacctc acctctctt cctactatca gcacacctc 120  
 cctgtggcgg ccatgttcat tgtggcctat gcgtcatct tctgtctgt catggiggc 180

31/33

```

aacaccctgg tctgtttcat cgtgctcaag aaccggcaca tgcatactgt caccaacatg 240
ttcatcctca acctggctgt cagtgacctg ctgggtgggca tcttcigcat gccaccacc 300
cttgtggaca acctcatcac tgggtggccc ttcgacaatg ccacatgaa gatgagcggc 360
ttgggtgcagg gcatgtctgt gtcggcttcc gtttcacac tgggtggccat tgcgtggaa 420
aggttccgt gcatcgtgca cctttccgc gagaagciga ccttgcgaa ggcgtcgtc 480
accatcgccg tcatctgggc cctggcgtg ctcatcatgt gtccctcggc cgtcacgtg 540
accgtaccc gtgaggagca ccactcaig gtggacggc gcaaccgtc ctaccgtc 600
tactcctgt gggaggcctg gcccagaag ggcatcgca gggctiacac cactgtgtc 660
ttctgcaca tctacciggc gccgtggcg ctcatcgtg tcatgtacgc ccgcatcgcg 720
cgcaagctct gccaggcccc gggccggcc cccggggcg aggaggctgc ggaccgcga 780
gcatcgcg gcagagcgc cgtggtcac atgtggtca tgggtggcgt gtcttcacg 840
ctgtcctggc tggcgtctg ggcgtgtg ctgtcatc actacgggca gtcagcgcg 900
ccgcagctgc acctggtcac cgtctacgc tccccctc cgcactggct ggccttctc 960
aacagcagcg ccaaccccat catctacgc tacticaac agaacttccg ccgcggttc 1020
caggccgct tccgcgccg cctcgtccc cgccgtcgg ggagccaca ggaggcctac 1080
tccgagcggc ccggcgggt tctgcacagg cgggtcttc tgggtgtgc gccagcgac 1140
tccgggtgc cctcgtgag gggccctagc agtggggccc ccaggcccg ccgcttccc 1200
ctgcggaatg ggcgggtggc tcaccacggc tigcccagg aagggcctgg ctgtccac 1260
ctgccccica ccattccagc ctgggatatc 1290

```

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 57

32/33

gtcgacatgg agggggagcc ctcccagcct c

31

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 58

actagttcag atatcccagg ctggaatgg

29

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 59

tatgagcctg aactttgaag aactgaaagat tgggttcga aaaatgtgat taaaatg 57

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 60

agcaccgccg cggtgaataa aatgccgcat agctttgcga atctgccgct gcgtttttgc 60

c

61

33/33

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 62

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 61

ggigctcatt ttaatcacat ttitcggacc ccaatctttc agttcttcaa agticaggct 60  
ca 62

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 62

tcggggcaaa aacgcagcgg cagattcgca aagctaigcgg catittattc accgccgg 58

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01716

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K38/22, 45/00, A61P5/10, 15/00, 15/08, 15/10, C07K14/72, 16/28, C12N15/12, C12Q1/02, G01N33/12, 33/50, 33/566, 33/53  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K38/22, 45/00, A61P5/10, 15/00, 15/08, 15/10, C07K14/72, 16/28, C12N15/12, C12Q1/02, G01N33/12, 33/50, 33/566, 33/53  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO, 2000/029441, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 25 May, 2000 (25.05.00) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.133:16312	1-15,18-31
P,X	HINUMA Shuji, et al., 'New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals.' Nat. Cell Biol., October, 2000, Vol.2, No.10, pages 703 to 708	1-15,18-31
A	SATAKE Honoo, et al., 'Characterization of a cDNA encoding a precursor of Carassius RFamide, structurally related to a mammalian prolactin-releasing peptide.' FEBS Lett., 1999, Vol.446, Nos.2,3, pages 247 to 250	1-15,18-31
A	TENSEN Cornelis P., et al., 'The Lymnaea cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family.' J. Neurosci., 1998, Vol.18, No.23, pages 9812 to 9821	1-15,18-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 May, 2001 (25.05.01)		Date of mailing of the international search report 12 June, 2001 (12.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01716

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/589621, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 December, 1998 (30.12.98) & EP, 1001989, A1 & JP, 11-71300, A	1-15,18-31
A	WO, 97/24436, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 July, 1997 (10.07.97) & EP, 870020, A2 & JP, 10-146192, A	1-15,18-31
X	Database REGISTRY on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), Registry Number of 225879-38-9, 203609-95-4, 179723-46-7, 167743-76-2	22



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01716

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 34,37,38  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 34, 37 and 38 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 16,17,32,33,35,36  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
It can be neither specified nor anticipated by a person skilled in the art what compounds are involved in the scope of the compounds obtained by using a screening method or a screening kit.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>1</sup> A61K38/22, 45/00, A61P5/10, 15/00, 15/08, 15/10, C07K14/72, 16/28, C12N15/12, C12Q1/02, G01N33/12, 33/50, 33/566, 33/53		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> A61K38/22, 45/00, A61P5/10, 15/00, 15/08, 15/10, C07K14/72, 16/28, C12N15/12, C12Q1/02, G01N33/12, 33/50, 33/566, 33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/029441, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 25.5月.2000 (25.05.00), (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 133:16312	1-15, 18-31
P, X	HINUMA Shuji, et al, 'New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals.' Nat. Cell Biol., Oct. 2000, Vol.2, No.10, pages 703 to 708	1-15, 18-31
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25.05.01	国際調査報告の発送日 12.06.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 3451	
	4C	9455

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SATAKE Honoo, et al, 'Characterization of a cDNA encoding a precursor of Carassius RFamide, structurally related to a mammalian prolactin-releasing peptide.' FEBS Lett., 1999, Vol. 446, No. 2, 3, pages 247 to 250	1-15, 18-31
A	TENSEN Cornelis P., et al, 'The Lymnaea cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family.' J. Neurosci., 1998, Vol. 18, No. 23, pages 9812 to 9821	1-15, 18-31
A	WO, 98/589621, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 30. 12月. 1998 (30. 12. 98) & EP, 1001989, A1 & JP, 11-71300, A	1-15, 18-31
A	WO, 97/24436, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) & EP, 870020, A2 & JP, 10-146192, A	1-15, 18-31
X	Database REGISTRY on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), Registry Number of 225879-38-9, 203609-95-4, 179723-46-7, 167743-76-2	22

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 34, 37, 38 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲34、37及び38は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 16, 17, 32, 33, 35, 36 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
スクリーニング方法又はスクリーニング用キットを用いて得られる化合物とは、いかなるものがそこに含まれるのか特定することができず、また、当該技術分野の専門家に予測のつくものでもない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。